

Departamento de Microbiología

Facultad de Biología



**Caracterización de genes de *Rhizobium tropici* CIAT  
899 implicados en la biosíntesis de los factores de  
nodulación independiente de la activación por  
flavonoides e inducidos por estrés osmótico**

Memoria presentada por Pablo del Cerro Sánchez para optar al  
título de Doctor

Sevilla, 2019



Departamento de Microbiología

Facultad de Biología



## LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Fdo. Francisco Javier Ollero  
Márquez. Catedrático.  
Departamento de Microbiología.  
Universidad de Sevilla.

Fdo. Francisco Pérez Montaña.  
Profesor Contratado Doctor.  
Departamento de Microbiología.  
Universidad de Sevilla.





Departamento de Microbiología

Facultad de Biología



**Mi agradecimiento al Ministerio de Educación,  
Cultura y Deporte (ayuda FPU14-00160) por haber  
hecho posible la realización de este trabajo**





---

- *No estás escribiendo...*

- *Estoy con mi tren, ¿te gusta? Lo acabo de comprar.*

- *¿Y desde cuando no escribís nada?*

- *Estuve de viaje...*

- *Quizás ya no tengas nada que decir. Mira aquí te marqué varios trabajos posibles.*

- *No necesito que me busques trabajo, estoy bien así, soy poeta.*

- *¿Qué oficio es ser poeta? Donde dice aquí: "Se busca poeta, buena remuneración".*



# AGRADECIMIENTOS

---



En primer lugar, me gustaría agradecer al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (ayuda FPU14-00160), y a la Universidad de Sevilla por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral. También a los miembros que componen la Unidad de Investigación de la Universidad de Sevilla por su eficiencia y su respuesta ante cualquier duda o problema que les he planteado. Quisiera agradecer a Isabel García Luque y a Francisco Javier Ollero Márquez, los directores del Dpto. de Microbiología de la Universidad de Sevilla durante el periodo de mi Tesis, por permitirme realizar la Tesis Doctoral en este Dpto. Además, agradecer formalmente a mis directores de Tesis Francisco Javier Ollero Márquez y Francisco Pérez Montaña por confiar en mí para realizar este proyecto de investigación.

(Portuñol) Eu quero tambem agradecer a la Dra. Mariangela Hungria (Embrapa Soja). Foi un prazer fazer um treinamento la chefe. Você fiz muitas coisas por mim, muito obrigado. Tambem quero agradecer a galera do laboratório: Artur, Renan, Leandro, Rebeca, Douglas (tambem Juliana), Dafila, Carol, Jesiane, Josiane, Andrey, Lully. Esos momentos em bar de Tomio...voces so amigos para sempre. Tambem a meu querida Bettina que ficou aqui em Sevilla, tu e la melhor do mundo!

(English) I would like to thank Myriam Charpentier (John Innes Centre) for giving me the possibility to join in her research group. Also for such good moments in the lab and for considering me as a friend. I can't wait to start the postdoc there! Also, to the other members of the Calcium signalling family: Aisling, Pierre, Nuno, Rik, I have no words to describe the good atmosphere that you have created in the lab. I feel like home! Finally, I would like to thank to other friends which are working there: Neftaly (Papi), Félix, Alba, Miguel, Javi, Pilar, Juanca, Estela, Roger, Abraham, Lola, Isa. Thank you guys!

Aunque ellos piensan que solo riego plantitas, también quiero agradecer a mis amigos que siempre han estado ahí: Paco, Pedro, Ricardo, Dani, Mario, Juanmi, Sergio, Héctor, Álvaro, Ángel, Antoñito, Man, David. También a otros amigos importantes que

han ido apareciendo a lo largo de mi vida: Juandi, Fani, Ana, Carmen, Adri, Zurita, Juanito, Álvaro, Silvia, Consu, Ale, Inma. Muchas gracias por todo.

Especialmente quiero agradecer a María del Rosario Espuny (Charo) por aceptarme como alumno interno. No tengo palabras para decirte todo lo que has hecho por mí desde el primer día. Gracias por enseñarme y hacer de la investigación una pasión para mí. Siempre te has portado como una madre en el laboratorio actuando por mi bien, incluso en aquellas ocasiones donde tú salías perdiendo. Gracias a ti me dedico a lo que me gusta. Muchas gracias. También a Ramón por ser un gran profesor y una buena persona conmigo. Siempre es muy agradable conversar contigo.

A continuación, quiero agradecer mis compañeros de Dpto. y de Facultad durante todos estos años: Antonio, José Enrique, Inés (ahora también Pilar), María Tortolero, Paco Romero, Ana Buendía, Puri, Carmen, Juan Carlos, Isabel, Servando, Joaquín, María del Mar, Cristina, Clara, Monre, Manolo, Antonio, Miguel Ángel (si me dejo a alguien que me perdone). Gracias por siempre recibirme cada mañana con una sonrisa, por esas conversaciones en los pasillos y por todos los buenos consejos que me habéis dado. También agradecer a Nuria, Rocío (y ahora Beatriz) por enseñarme a dar mis primeros pasos en un laboratorio. También por esas risas en la cocina. Muchas gracias.

Quiero agradecer a los miembros de la riñonera por tan buenos momentos. Julia y María, excelente científicas aunque siempre llegando tarde al Aljibe. Hemos pasado muy buenos momentos de risas. Vosotras sois las perfectas personas con las que hablar de ciencia e irse de fiesta, en cualquier orden. Guille, el puntillitas, ahora el *influencer* y futuro Dr. Love del grupo. Muchas gracias por todas esas risas que la mayoría de las veces (o siempre) solo entendemos tú y yo, recuerda que somos mejores amigos (lo pone en Facebook). Raquel, aunque lejos de la Facultad has sido como una más, siempre promoviendo hacer planes (con una tranquilidad a veces alarmante, jeje) sé que vas a hacer siempre lo correcto, valeu... Y mi querida Pilar, que no sabía dónde meterte porque siempre estás ahí para mí. Eres mi mejor amiga.



No hay palabras para agradecerte todo lo que haces por mí día a día (guau, guau). Seremos amigos para siempre (noooo... jaja). También a las nuevas incorporaciones de la riñonera, Oksana y Alejandro, aunque trabajéis con reggaetón os estoy cogiendo mucho cariño ¡Gracias por todo riñoner@s!

También agradecer a Edu (Dusinho para los amigos) por esos buenos ratos en ciencia, tomando cervecitas y jugando al fútbol. En cuanto a los rizobiólogos del L4, quiero agradecer en primer lugar a su líder culé José María Vinardell. Eres el Messi de *S. fredii* HH103 (a pesar de que a otros le moleste reconocerlo). También eres una inspiración tanto en lo científico como en lo personal para mí. Muchas gracias por todo y espero que podamos seguir trabajando y riendo juntos en el futuro. También al nuevo fichajazo del grupo, Carlos, gracias por esas bromas, distracciones y conversaciones por el laboratorio. Teresa, muchas gracias por siempre saludar con una sonrisa y por ser tan cariñosa conmigo. Otro fichaje en calidad de joven promesa, Andrés, el supermegacientífico biotecnológico de la mejor universidad del universo, eres un gran colega (a veces amigo también), sigue así que sé que vas a llegar muy lejos. Llegó el momento de agradecer a Chanito, la persona más buena que he conocido nunca, jamás has tenido un gesto feo con nadie (¡y mira que has tenido motivos!) eres un gran amigo, siempre vas a poder contar conmigo.

Quiero continuar con las personas del L6. Al gran padre/científico/amigo/persona Javi, gracias por todos los buenos momentos que me has hecho pasar, por todo lo que me has enseñado y por ser tan buen amigo (y por ayudarme con las barbacoas). Aprovecho para dar las gracias a Marina ¡No hay quien no se ría contigo! También a mi querida Isamar a la que echo de menos a diario. Más gente como tú hace falta en el mundo. Mucha suerte en tu nueva etapa. Rubio (tíñete), cuadrado, este es Pablo Buzón. Gracias por todas esas conversaciones y risas, espero que te vaya todo muy bien amigo. También a todas las buenas personas que han pasado por el laboratorio: Laura, Catherine, Rocío, Maut, Serra. Gracias.

Se va a acercando el final. Ahora sigo por el L3, donde está mi compañera de mesa Cynthia. Nunca olvidaré el grito de alegría sincero que distes cuando comprobamos juntos que me habían concedido la beca FPU. Aunque no te lo diga a menudo (o más bien nunca), te aprecio muchísimo. Espero que las cosas salgan bien para ti y para los tuyos, puedes contar conmigo siempre. En cuanto a mi Irene, no me puedo creer que me encuentre escribiendo esto, como pasa el tiempo, muchas gracias por ser tan buena amiga durante todos estos años. Eres la persona más justa y leal que conozco, sé que vas a ser una gran científica y espero estar ahí contigo para verlo. Ahora a mi director Pakito (ya sin formalidades), gracias por ser como un hermano para mí. Siempre me has considerado como parte de tu vida, de tus amigos e incluso de tu familia. Gracias por todo lo que me has enseñado y por haber cuidado tan bien de mí. Gracias por ser tan buen amigo. También a la sangre de mi sangre, Paula, dejo mis expectativas puestas en la gran Tesis que vas a hacer, eres una gran persona y espero que podamos seguir trabajando juntos en el futuro.

A mi director Ollerito no sabría por dónde empezar. Bendita locura ha sido ser tu doctorando. A pesar de nuestras peleas por nuestra cabezonería, sé que siempre has sido sincero conmigo y que has actuado por mi bien. Jamás podría haber tenido un director mejor que tú. Gracias por confiar tanto en mí y por ser tan buen amigo. Eres una de mis personas favoritas en el mundo, te voy a echar mucho de menos,. ¿Quién te va a decir ahora si estás nervioso? ¡No me olvides por favor! ¡AHHHHHH!

Finalmente quiero agradecer también a mis hermanos. Carlos, tú siempre has sido un ejemplo para mí. Jamás he conocido a alguien tan brillante como tú. Hoy soy la persona que soy gracias a ti. En cuanto a ti, Blanca, bebé, babuchita mágica, perrito, titi, mamá, antorcha, compañera, amiga, novia... No sé qué decir, 6 años juntos donde hemos vivido tantas cosas y a la vez tan pocas. Gracias por todo el cariño que me has dado siempre, por esas risas, por hacerme olvidar mis problemas. Espero que estos 6 años solo sean el inicio de lo que nos espera. Y, por último, a las personas más importantes en mi vida: mis padres. Gracias a vosotros por la educación que me habéis dado. Más bien gracias por habérmelo dado todo. Pablo y María Luisa, esta Tesis Doctoral es vuestra, vosotros sois los verdaderos doctores.

# ÍNDICE

---



## **Resumen**

Resumen en español .....	3
English abstract .....	5

## **Introducción**

La simbiosis rizobio-leguminosa .....	9
Antecedentes .....	9
El establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa .....	10
Los genes de nodulación .....	14
El regulador transcripcional NodD .....	16
Otros reguladores transcripcionales de interés .....	17
Reguladores de la familia ArsR: NodR .....	17
Reguladores de la familia AraC .....	18
Los factores de nodulación (FN) .....	19
Filogenia .....	20
Otros factores relevantes en la simbiosis rizobio-leguminosa .....	21
Polisacáridos de superficie .....	21
Formación de biopelículas .....	23
Percepción de quórum o quorum sensing (QS) .....	24
Movilidad bacteriana .....	25
Producción de ácido indolacético (AIA) .....	26
Sistemas de secreción bacterianos .....	27
El macrosimbionte: las leguminosas .....	29
<i>Phaseolus vulgaris</i> .....	29
<i>Leucaena leucocephala</i> .....	29
<i>Lotus japonicus</i> y <i>Lotus burttii</i> .....	29
El microsimbionte: <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 .....	31
Antecedentes .....	31
Filogenia de <i>R. tropici</i> CIAT 899 .....	31
El genoma de <i>R. tropici</i> CIAT 899 .....	32
Producción de FN en presencia de flavonoides y estrés salino .....	35

## **Objetivos**

Objetivos .....	39
-----------------	----

## **Material y Métodos**

Estirpes y plásmidos utilizados.....	43
Estirpes bacterianas .....	43
Estirpes de <i>Escherichia coli</i> .....	43
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 y sus derivados.....	43
Otras estirpes .....	45
Plásmidos.....	45
Medios y agentes selectivos .....	49
Medios de cultivo .....	49
Medios para <i>Rhizobium</i> .....	49
Medios para <i>E. coli</i> .....	50
Medios para <i>Azospirillum</i> .....	51
Medio de conservación de bacterias .....	52
Medidas de pH y espectrofotometría .....	52
Agentes selectivos.....	52
Flavonoides .....	53
Técnicas de biología molecular .....	55
Conjugación bacteriana triparental .....	55
Transformación en <i>E. coli</i> .....	55
Extracción del ADN total .....	56
Extracción del ADN plasmídico (minipreps) .....	57
Restricción del ADN.....	57
Electroforesis del ADN.....	57
Aislamiento del ADN de geles de agarosa.....	58
Desfosforilación del ADN .....	58
Ligación del ADN.....	59
Amplificación del ADN por PCR.....	59
Hibridación ADN:ADN.....	60
Secuenciación del ADN y búsqueda de promotores .....	62
Mutagénesis .....	63
Mutagénesis dirigida mediante inserción del interposón $\Omega$ .....	63
Mutagénesis dirigida por delección no polar utilizando el método de PCR solapante .....	66
Estudios de polisacáridos .....	68
Estimación de la cantidad de EPS: El método de la antrona- $H_2SO_4$ .....	68
Estudio de los EPS de <i>R. tropici</i> CIAT 899 por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) .....	69
Estudio de los LPS .....	69
Ensayos de formación de biopelículas.....	72
Ensayos de detección de AHL .....	73

Extracción, separación y detección de AHL mediante cromatografía en capa fina (TLC).	73
Ensayos de movilidad en superficie y movilidad tipo <i>swimming</i>	74
Cuantificación de la producción de ácido indolacético (AIA)	74
Cuantificación de la expresión de genes bacterianos por PCR cuantitativa	75
Medida de la actividad $\beta$ -galactosidasa	78
Estudios de ARNseq	79
Mapeo de los datos de las transcriptómicas	79
Estimación de los genes diferencialmente expresados	80
Purificación y análisis por cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas de los FN	80
Purificación y análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de los FN	82
Material y métodos para los estudios con plantas	83
Plantas utilizadas en esta Tesis	83
Soluciones nutritivas para las plantas	83
Desinfección y germinación de semillas	84
Inoculación y cultivo de plantas: Jarro de Leonard (Vincent, 1970)	84
Sistema de hidroponía en tubo: ensayos de actividad biológica de los FN	85
Ensayos de nodulación	85
Aislamientos de las bacterias de los nódulos	86
Estimación de la actividad nitrogenasa	86

## **Resultados**

Análisis transcriptómico de <i>R. tropici</i> CIAT 899 en presencia de flavonoides y estrés osmótico	91
Antecedentes	91
Expresión de los genes de <i>nod</i> en presencia de diferentes estreses osmóticos	92
Estudios transcriptómicos globales mediante ARNseq	94
Validación de datos de transcriptómica por qRT-PCR	95
Transcriptómica de <i>R. tropici</i> CIAT 899 en presencia del flavonoide apigenina	96
Transcriptómica de <i>R. tropici</i> CIAT 899 en presencia de estrés osmótico iónico (NaCl)	98
Transcriptómica de <i>R. tropici</i> CIAT 899 en presencia de estrés osmótico no-iónico (manitol)	100
La producción de ácido indolacético (AIA) se induce en <i>R. tropici</i> CIAT 899 en presencia de apigenina y estrés salino	102
Otros genes implicados en procesos bacterianos relevantes son también diferencialmente expresados en presencia de estrés osmótico	103
Procesos regulados en presencia de estrés osmótico iónico (NaCl)	103
Procesos regulados en presencia de estrés osmótico no-iónico (manitol)	104

Estudio del papel simbiótico de los cinco reguladores NodD de <i>R. tropici</i> CIAT 899.	107
Antecedentes.....	107
Obtención de mutantes.....	107
NodD1 y NodD2 activan el promotor del gen <i>nodA</i> de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> en presencia de apigenina y estrés osmótico, respectivamente .....	108
Estudio transcriptómico de los mutantes RSP82 y <i>nodD2::Ω</i> en presencia de apigenina y estrés osmótico .....	110
Validación de datos de transcriptómica por qRT-PCR. ....	114
Determinación por espectrometría de masas de los FN producidos en apigenina y estrés salino en CIAT 899 y mutantes <i>nodD</i> .....	116
La síntesis de FN en presencia de apigenina y estrés osmótico está regulada por NodD1 y NodD2, respectivamente .....	117
Ensayos de nodulación de los mutantes <i>nodD</i> de <i>R. tropici</i> CIAT 899 con diferentes leguminosas .....	118
La producción de AIA en <i>R. tropici</i> CIAT 899 está regulada por NodD1 y NodD2.....	120
Obtención de un doble mutante $\Delta nodD1/\Delta nodD2$ y caracterización fenotípica.....	121
Los FN producidos por <i>R. tropici</i> CIAT 899 en presencia de apigenina y estrés salino tienen actividad biológica en <i>P. vulgaris</i> . ....	123
Estudio del papel simbiótico de las tres proteínas NodA de <i>R. tropici</i> CIAT 899 ....	125
Antecedentes.....	125
Producción de FN en presencia de apigenina y estrés salino en los mutantes de los genes <i>nodA</i> .....	125
Caracterización fenotípica de los mutantes en los genes <i>nodA</i> en la simbiosis con diferentes leguminosas.....	129
Actividad biológica de los FN producidos por <i>R. tropici</i> CIAT 899 y los mutantes $\Delta nodA1A3$ y $\Delta nodA1A2A3$ en <i>P. vulgaris</i> .....	130
Caracterización de otros genes implicados en la síntesis de FN bajo estrés osmótico .....	133
NrcR, regulador transcripcional de la familia ArsR. ....	133
Antecedentes.....	133
Ensayos de qRT-PCR en <i>R. tropici</i> CIAT 899 y en el mutante <i>nrcR::Ω</i> en presencia de apigenina y estrés osmótico.....	133
Análisis de los FN producidos en <i>R. tropici</i> CIAT 899 y en el mutante <i>nrcR::Ω</i> en presencia de apigenina y estrés salino .....	134
Ensayos de nodulación de <i>R. tropici</i> CIAT 899 y <i>nrcR::Ω</i> en <i>P. vulgaris</i> y <i>L. leucocephala</i> . ....	136
Ensayos de competitividad en <i>P. vulgaris</i> muestran que el mutante <i>nrcR::Ω</i> es menos competitivo que la estirpe silvestre .....	137
NrcR regula otros fenotipos bacterianos que son relevantes en la simbiosis rizobio-leguminosa .....	138
AraC, un regulador transcripcional de la familia AraC próximo a <i>nodD2</i> en el genoma de <i>R. tropici</i> CIAT 899 .....	140



Antecedentes.....	140
Los estudios de ARNseq muestran que AraC es esencial para la activación de los genes <i>nod</i> en presencia de estrés salino.....	141
La síntesis de FN en presencia de estrés salino está regulada por AraC .....	144
Ensayos de nodulación de <i>R. tropici</i> CIAT 899 y $\Delta$ <i>araC</i> en <i>P. vulgaris</i> y <i>L. leucocephala</i> ....	146

## **Discusión**

Discusión general .....	151
Interpretación de los datos transcriptómicos .....	151
En la activación de la síntesis de los FN en <i>R. tropici</i> CIAT 899 intervienen diferentes reguladores transcripcionales .....	157
Hasta tres genes <i>nodA</i> garantizan la síntesis de FN en <i>R. tropici</i> CIAT 899 .....	162
Las dos vías de síntesis de FN en <i>R. tropici</i> CIAT 899 son relevantes para el establecimiento de la simbiosis con leguminosas .....	164
Perspectivas de futuro .....	169

## **Conclusión**

Conclusiones .....	173
Conclusions .....	175

## **Bibliografía**

Bibliografía.....	179
-------------------	-----

## **Anexos**

Anexos.....	199
-------------	-----



# ÍNDICE DE FIGURAS

---



<b>Figura 1</b> – Esquema de la regulación de la síntesis de los FN en los rizobios. Las flechas negras representan activación descrita. ....	11
<b>Figura 2</b> – Esquema de la cascada regulatoria activada por la recepción del FN en el pelo radical. La flecha discontinua indica que la activación podría ser directa o indirecta. ....	12
<b>Figura 3</b> – Esquema de la colonización de la raíz de la leguminosa por parte de los rizobios. ....	13
<b>Figura 4</b> – Modelo estructural del dímero de NodD1 de <i>S. meliloti</i> (Peck <i>et al.</i> , 2013). Esta imagen ha sido cedida por Roger Castells (John Innes Centre, Norwich, Reino Unido). ....	17
<b>Figura 5</b> – Estructura de los FN y sus decoraciones descritas. También se muestran las proteínas que llevan a cabo la síntesis y las decoraciones del FN. Figura adaptada de Perret <i>et al.</i> , 2000. ....	20
<b>Figura 6</b> – Árbol filogenético a partir de las secuencias del ARNr 16S. Los géneros en negrita contienen especies de rizobios. Los paréntesis y corchetes indican que el genoma ha sido secuenciado. Figura tomada de Masson-Boivin <i>et al.</i> (2009). ....	21
<b>Figura 7</b> - Esquema de la superficie rizobiana en la que se muestra la disposición de los polisacáridos superficiales. ME: Membrana externa; EP: Espacio periplásmico; MC: Membrana citoplasmática; EPS: Exopolisacáridos; GC: Glucanos cíclicos; LPS: Lipopolisacáridos; KPS: Polisacárido capsular de tipo antígeno-K; FL: Fosfolípidos; PM: Proteínas de membrana. Figura tomada de Vinardell <i>et al.</i> , 2005. ....	23
<b>Figura 8</b> – Algunos de los tipos de movilidad bacteriana más estudiados. Figura adaptada de Kearns, 2010. ....	26
<b>Figura 9</b> - Relaciones genómicas entre <i>R. tropici</i> CIAT 899 y otros rizobios o relacionados basado en el índice de las distancias de genomas MUMi. Esta figura ha sido tomada de Ormeño-Orrillo <i>et al.</i> , 2012. ....	32
<b>Figura 10</b> – Genes <i>nod</i> descritos hasta la fecha y presentes en el plásmido simbiótico de <i>R. tropici</i> CIAT 899. ....	34

**Figura 11** - Efecto del estrés salino (NaCl 300 mM) en la biosíntesis de FN determinado por cromatografía en capa fina y análisis de la expresión de los genes *nod* cuantificada por actividad  $\beta$ -galactosidasa (promotor *nodP::lacZ*) en *R. tropici* CIAT 899. Las condiciones fueron medio B<sup>-</sup> (control) y medio B<sup>-</sup> suplementado con 300 mM NaCl (NaCl). Los carriles marcados con + fueron suplementados con apigenina (1  $\mu$ M). Figuras tomadas de Guasch-Vidal *et al.*, 2013.....35

**Figura 12** – Alineación de las secuencias correspondientes a las NB de *R. tropici* CIAT 899. Los residuos marcados con negro y gris indican nucleótidos idénticos y similares, respectivamente. En el *consensus* se marcan los nucleótidos altamente conservados en las diez NB. ....92

**Figura 13** – Ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en la estirpe *R. tropici* CIAT 899 (pMP240) en condiciones control (YM3), apigenina (3,7  $\mu$ M), NaCl (300 mM), manitol (400 mM) y sacarosa (400 mM). Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos en el tratamiento control mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores marcados con \* son significativamente diferentes al nivel  $\alpha = 5\%$ . ....93

**Figura 14** – Niveles de correlación entre los experimentos de ARNseq y qRT-PCR en las condiciones de apigenina (A), NaCl (B) y manitol (C). Se validaron para cada condición los genes indicados en la figura. ....96

**Figura 15** – Producción de AIA en *R. tropici* CIAT 899 en condiciones control, presencia de apigenina (3,7  $\mu$ M) o NaCl (300 mM). La producción de AIA relativa se calculó con respecto a la que se produjo en condiciones control. Las diferencias en cuanto a la producción de AIA relativa se calcularon siguiendo el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los \* indican una diferencia significativa al nivel de  $\alpha = 5\%$ . ....102

**Figura 16** – Principales procesos regulados diferencialmente en *R. tropici* CIAT 899 según los datos transcriptómicos llevados a cabo en condiciones de 300 mM de NaCl. En rojo se muestran los procesos reprimidos y en negro los activados. ....104

**Figura 17** – Principales procesos regulados diferencialmente en *R. tropici* CIAT 899 según los datos transcriptómicos llevados a cabo en condiciones de 400 mM de manitol. En rojo se muestran los procesos reprimidos y en negro los activados. ...105

**Figura 18** – Ejemplo de comprobación por PCR e hibridación del mutante *nodD3:: $\Omega$*  en *R. tropici* CIAT 899. En la hibridación, el ADN extraído del mutante *nodD3:: $\Omega$*  fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI*. ....108

**Figura 19** – Ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en la estirpe *R. tropici* CIAT 899 (pMP240) y los diferentes mutantes en los genes *nodD* (pMP240) en condiciones control (YM3, barras azules), apigenina 3,7  $\mu$ M (barras rojas), NaCl 300 mM (barras grises) y manitol 400 mM (barras amarillas). Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos en el tratamiento de CIAT 899 (pMP240) control mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores con \* son significativamente diferentes a nivel  $\alpha = 5\%$ . ..... 109

**Figura 20** – Niveles de correlación entre los experimentos de ARNseq y qRT-PCR en los mutantes RSP82 (A, C, E) y *nodD2:: $\Omega$*  (B, D, F, G) en condiciones control (A, B), en presencia de apigenina (C, D), estrés salino (E, F) y estrés osmótico por manitol (G). Para A-F se validaron los genes *nodA1*, *nodA2*, *nodM*, *y4wE*, *RTCIAT899\_PB01550* y *nodD2*, mientras que para G se validaron los genes *fixC*, *mtlD*, *nodA3*, *nodF*, *nifH*, *nodA2*, *mtlE*. ..... 115

**Figura 21** – Ensayos de TLC en la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 y los mutantes RSP82 y *nodD2:: $\Omega$*  en condiciones control (-), NaCl 300 mM (S) y 3,7  $\mu$ M apigenina (A). ..... 118

**Figura 22** – Ensayos de TLC en la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 y en el mutante *nodD2:: $\Omega$*  en condiciones control (-) y 400 mM manitol (M). ..... 118

**Figura 23** – Producción de AIA en *R. tropici* CIAT 899 (barras grises) y los mutantes RSP82 (barras azules) y *nodD2:: $\Omega$*  (barras rojas). Cuando se requirió, se añadió apigenina (3,7  $\mu$ M) o NaCl (300 mM). La producción de AIA se relativizó con respecto a la producción en las condiciones control de la estirpe parental. Las diferencias en cuanto a la producción de AIA relativa se calculó siguiendo el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los \* indican una diferencia significativa al nivel de  $\alpha = 5\%$ . ..... 120

**Figura 24** – A. Ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en la estirpe *R. tropici* CIAT 899 (pMP240) y el mutante  $\Delta$ *nodD1*/ $\Delta$ *nodD2* (pMP240) en condiciones control (barras azules), NaCl 300 mM (barras rojas) y apigenina 3,7  $\mu$ M (barras grises). Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos en el tratamiento de *R. tropici* CIAT 899 (pMP240) control mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Valores con \* son significativamente diferentes al nivel  $\alpha = 5\%$ . B. Ensayos de TLC en la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 y el mutante  $\Delta$ *nodD1*/ $\Delta$ *nodD2* en condiciones control (-), NaCl 300 mM (S) y 3,7  $\mu$ M apigenina (A). ..... 122

**Figura 25** – Comprobación por PCR (A) e hibridación (B) de todos los mutantes por delección obtenidos para los genes *nodA* en *R. tropici* CIAT 899. ..... 126

**Figura 26** – Ensayos de TLC en la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 y los mutantes en los genes *nodA* en NaCl 300 mM y 3,7  $\mu$ M apigenina. (-) y (+) indican la ausencia o presencia, respectivamente, de los inductores de los genes *nod* apigenina y NaCl. .... 127

**Figura 27** – Ensayos de qRT-PCR de la expresión del gen *nodC* en *R. tropici* CIAT 899 (barras azules) y en el mutante *nrcR:: $\Omega$*  (barras rojas) en condiciones control (TY), NaCl (TY + 300 mM NaCl) y apigenina (TY + 3,7  $\mu$ M). Los datos de expresión se compararon individualmente con la expresión del control de la estirpe parental sin inductores utilizando test no paramétrico de Mann-Whitney. Los \* indican una diferencia significativa a nivel  $\alpha = 5\%$ ..... 134

**Figura 28** – Ensayos de competitividad entre *R. tropici* CIAT 899 y el mutante *nrcR:: $\Omega$*  en *P. vulgaris*. Los porcentajes de ocupación de nódulos se midieron para ambas cepas tras 45 días de coinoculación. Los datos obtenidos para la estirpe *nrcR:: $\Omega$*  se compararon individualmente con los obtenidos en la estirpe *R. tropici* CIAT 899 mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. El valor marcado por asterisco \* es significativamente diferente a nivel  $\alpha = 5\%$  ..... 137

**Figura 29** – Ensayos de movilidad en superficie de *R. tropici* CIAT 899 (línea azul), del mutante *nrcR:: $\Omega$*  (línea gris) y del mutante complementado *nrcR:: $\Omega$*  (pMUS1333) (línea roja) en condiciones control (A), presencia de apigenina 3,7  $\mu$ M (B) y NaCl 300 mM (C). Se cuantificó el diámetro del halo formado. Los valores obtenidos en las estirpes *nrcR:: $\Omega$*  y *nrcR:: $\Omega$*  (pMUS1333) se compararon individualmente con la estirpe parental en cada condición mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores marcados por \* son significativamente diferentes ( $\alpha = 5\%$ ). .... 139

**Figura 30** – Producción de EPS de *R. tropici* CIAT 899 (barras azules), *nrcR:: $\Omega$*  (barras grises) y *nrcR:: $\Omega$*  (pMUS1333) (barras rojas). Los valores se relativizaron a aquellos valores obtenidos en *R. tropici* CIAT 899 en condiciones control. Los valores obtenidos en las estirpes *nrcR:: $\Omega$*  y *nrcR:: $\Omega$*  (pMUS1333) se compararon individualmente con la estirpe parental en cada condición mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores marcados por \* son significativamente diferentes ( $\alpha = 5\%$ ). .... 140

**Figura 31** – Ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en las estirpes *R. tropici* CIAT 899 (pMP240) y  $\Delta$ *araC* (pMP240) en condiciones control (barras azules), NaCl 300 mM (barras rojas) y apigenina 3,7  $\mu$ M (barras grises). Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos en el tratamiento CIAT 899 (pMP240) control mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Valores con \* son significativamente diferentes al nivel  $\alpha = 5\%$ . .... 141



**Figura 32** – Ensayos de TLC en la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 y el mutante  $\Delta araC$  en condiciones control (-), NaCl 300 mM (S) y 3,7  $\mu$ M apigenina (A). ..... 145

**Figura 33** – Posible actuación de AraC en condiciones de estrés osmótico en *R. tropici* CIAT 899. Las flechas negras representan activación descrita. Las flechas rojas representan una hipotética activación..... 161

**Figura 34** – Posible mecanismo de activación de los genes *nod* y los genes de síntesis de AIA en la rizosfera tanto en presencia de flavonoide como de estrés osmótico en *R. tropici* CIAT 899. Las flechas negras representan activación descrita. Las flechas rojas representan activación hipotética. Las flechas discontinuas indican que la activación podría ser directa o indirecta..... 166

**Figura 35** – Posible mecanismo de activación de los genes *nod*, síntesis de AIA y otros fenotipos en el interior del tubo de infección en *R. tropici* CIAT 899. Las flechas negras representan activación descrita. Las flechas rojas representan activación hipotética. Las flechas discontinuas indican que la activación podría ser directa o indirecta. .... 166



# ÍNDICE DE TABLAS

---



<b>Tabla 1</b> – Funciones de algunos genes <i>nod</i> presentes en los rizobios. ....	15
<b>Tabla 2</b> – Información relevante obtenida en la secuenciación del genoma de <i>R. tropici</i> CIAT 899.....	33
<b>Tabla 3</b> – Genes <i>nod</i> de <i>R. tropici</i> CIAT 899 cuya función ha sido descrita. ....	34
<b>Tabla 4</b> – Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas en la presente Tesis Doctoral.....	43
<b>Tabla 5</b> – Estirpes de <i>R. tropici</i> CIAT 899 utilizadas en la presente Tesis Doctoral. ....	43
<b>Tabla 6</b> – Otras estirpes utilizadas en la presente Tesis Doctoral.....	45
<b>Tabla 7</b> – Plásmidos utilizados en la presente Tesis Doctoral.....	45
<b>Tabla 8</b> – Componentes del medio TY. ....	49
<b>Tabla 9</b> – Componentes del medio YM. ....	49
<b>Tabla 10</b> – Componentes del medio B <sup>-</sup> .....	50
<b>Tabla 11</b> – Solución de oligoelementos del medio B <sup>-</sup> . ....	50
<b>Tabla 12</b> – Componentes del medio LB. ....	50
<b>Tabla 13</b> – Componentes del medio NFb. ....	51
<b>Tabla 14</b> – Solución de vitaminas del medio NFb.....	51
<b>Tabla 15</b> – Agentes selectivos.....	52
<b>Tabla 16</b> – Soluciones empleadas en las transformaciones bacterianas. ....	56
<b>Tabla 17</b> – Soluciones empleadas en la electroforesis del ADN. ....	58

<b>Tabla 18</b> – Soluciones empleadas en la hibridación ADN:ADN (I). ....	61
<b>Tabla 19</b> – Soluciones empleadas en la hibridación ADN:ADN (II).....	61
<b>Tabla 20</b> – Soluciones empleadas en la hibridación ADN:ADN (III).....	62
<b>Tabla 21</b> - Cebadores utilizados en esta Tesis para mutagenizar genes por inserción del interposón $\Omega$ . ....	65
<b>Tabla 22</b> - Cebadores utilizados para mutagenizar genes por delección mediante PCR solapante.....	67
<b>Tabla 23</b> – Soluciones empleadas en el estudio de LPS (I).....	70
<b>Tabla 24</b> – Soluciones empleadas en el estudio de LPS (II).....	71
<b>Tabla 25</b> – Soluciones empleadas en el estudio de LPS (III).....	72
<b>Tabla 26</b> – Soluciones empleadas en el estudio de AIA. ....	75
<b>Tabla 27</b> - Cebadores utilizados en los experimentos de qRT-PCR.....	76
<b>Tabla 28</b> – Soluciones empleadas en la medida de actividad $\beta$ -galactosidasa. ....	78
<b>Tabla 29</b> – Solución de Fåhræus. ....	83
<b>Tabla 30</b> – Solución de Gibson. ....	83
<b>Tabla 31</b> – Condiciones utilizadas en los ensayos de $\beta$ -galactosidasa utilizando la estirpe <i>R. tropici</i> CIAT 899 (pMP240).....	92
<b>Tabla 32</b> – Genes <i>nod</i> o regulados por una NB de <i>R. tropici</i> CIAT 899 diferencialmente expresados ( $\pm 4$ ) en 3,7 $\mu$ M de apigenina con respecto al control. ....	97

<b>Tabla 33</b> – Genes <i>nod</i> , de fijación de nitrógeno o regulados por una NB de <i>R. tropici</i> CIAT 899 diferencialmente activados ( $\pm 4$ ) en presencia de NaCl 300 mM.....	99
<b>Tabla 34</b> – Genes <i>nod</i> , de fijación de nitrógeno o regulados por una NB de <i>R. tropici</i> CIAT 899 diferencialmente activados ( $\pm 2,5$ ) en presencia de 400 mM de manitol. ....	101
<b>Tabla 35</b> – Expresión diferencial de todos los genes <i>nod</i> o regulados por NB y diferencialmente expresados en <i>R. tropici</i> CIAT 899 y sus derivados RSP82 y <i>nodD2::Ω</i> en presencia de 3,7 $\mu$ M de apigenina.....	111
<b>Tabla 36</b> – Expresión diferencial de todos los genes <i>nod</i> o regulados por NB y diferencialmente expresados en <i>R. tropici</i> CIAT 899 y los mutantes RSP82 y <i>nodD2::Ω</i> en presencia de 300 mM de NaCl con respecto a la estirpe parental en condiciones control. ....	112
<b>Tabla 37</b> - Expresión diferencial de todos los genes <i>nod</i> o regulados por NB y diferencialmente expresados en <i>R. tropici</i> CIAT 899 y el mutante <i>nodD2::Ω</i> en presencia de 400 mM de manitol con respecto a la estirpe parental en condiciones control. ....	113
<b>Tabla 38</b> – Número total de FN producidos por la estirpe parental <i>R. tropici</i> CIAT 899 y los mutantes en los genes <i>nodD</i> en condiciones control, NaCl 300 mM y apigenina 3,7 $\mu$ M.....	116
<b>Tabla 39</b> – Fenotipo simbiótico de <i>R. tropici</i> CIAT 899 y sus derivados afectados en los genes <i>nodD</i> en <i>P. vulgaris</i> , <i>L. leucocephala</i> , <i>L. japonicus</i> y <i>L. burttii</i> .....	119
<b>Tabla 40</b> – Fenotipo simbiótico de <i>R. tropici</i> CIAT 899 y el mutante $\Delta nodD1/\Delta nodD2$ en <i>P. vulgaris</i> y <i>L. burttii</i> .....	123
<b>Tabla 41</b> – Ensayos de actividad biológica de los FN en <i>P. vulgaris</i> .....	124
<b>Tabla 42</b> – FN producidos por los mutantes $\Delta nodA1A3$ y $\Delta nodA1A2A3$ en presencia de apigenina 3,7 $\mu$ M. ....	128
<b>Tabla 43</b> – FN producidos por los mutantes $\Delta nodA1A3$ y $\Delta nodA1A2A3$ en presencia de NaCl 300 mM.....	128

<b>Tabla 44</b> – Fenotipo simbiótico de <i>R. tropici</i> CIAT 899 y sus derivados afectados en los genes <i>nodA</i> en <i>P. vulgaris</i> , <i>L. leucocephala</i> , <i>L. japonicus</i> y <i>L. burttii</i> .	130
<b>Tabla 45</b> – Ensayos de actividad biológica de los FN aplicados en raíces de <i>P. vulgaris</i> .	131
<b>Tabla 46</b> – Número total de FN producidos por la estirpe parental <i>R. tropici</i> CIAT 899 y el mutante <i>nrcR::Ω</i> en condiciones control (B <sup>-</sup> ), NaCl 300 mM y apigenina 3,7 μM.	135
<b>Tabla 47</b> – Fenotipo simbiótico de <i>R. tropici</i> CIAT 899, el mutante <i>nrcR::Ω</i> , <i>nrcR::Ω</i> (pMUS1333) y <i>nrcR::Ω::pMUS1353</i> en <i>P. vulgaris</i> y <i>L. leucocephala</i> .	136
<b>Tabla 48</b> – Expresión diferencial de todos los genes <i>nod</i> o de los genes regulados por NB y diferencialmente expresados en <i>R. tropici</i> CIAT 899 y el mutante $\Delta araC$ en presencia de 300 mM de NaCl con respecto al control de la estirpe parental.	142
<b>Tabla 49</b> – Expresión diferencial de todos los genes <i>nod</i> o de los genes regulados por NB y diferencialmente expresados en <i>R. tropici</i> CIAT 899 y el mutante $\Delta araC$ en presencia de 3,7 μM de apigenina con respecto al control.	144
<b>Tabla 50</b> – FN producidos por la estirpe parental <i>R. tropici</i> CIAT 899 y el mutante $\Delta araC$ en condiciones control (B <sup>-</sup> ), NaCl 300 mM y apigenina 3,7 μM.	146
<b>Tabla 51</b> – Fenotipo simbiótico de <i>R. tropici</i> CIAT 899 y el mutante $\Delta araC$ en <i>P. vulgaris</i> y <i>L. leucocephala</i> .	146
<b>Tabla 52</b> – Expresión diferencial de todos los genes <i>nod</i> descritos en <i>R. tropici</i> CIAT 899 en presencia de 300 mM de NaCl, 400 mM de manitol y 3.7 μM de apigenina.	153
<b>Tabla 53</b> – Inducción de la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en diferentes leguminosas por <i>R. tropici</i> CIAT 899 y algunos de sus mutantes.	168



## ABREVIATURAS

---



- *AHL: N-acil-homoserina lactonas.*
- *AIA: Ácido Indolacético.*
- *EPS: Exopolisacáridos.*
- *FBN: Fijación biológica del nitrógeno.*
- *FN: Factor de nodulación.*
- *GC: Glucanos cíclicos.*
- *HTH: Helix-Turn-Helix.*
- *KPS: Polisacáridos capsulares.*
- *LCO: Lipoquitoligosacarido.*
- *LPS: Lipopolisacáridos.*
- *NAcGlu: N-acetilglucosamina.*
- *NB: Caja de nodulación. Del inglés nod-box.*
- *NN: Número de nódulos.*
- *nod: nodulación.*
- *pA: pRtrCIAT899a.*
- *pB: pRtrCIAT899b.*
- *pC: pRtrCIAT899c.*
- *PSPA: Peso seco parte aérea.*
- *QS: Quorum sensing.*
- *RMN: Resonancia magnética nuclear.*
- *SST3: Sistema de secreción tipo III.*
- *SST4: Sistema de secreción tipo IV.*
- *SST5: Sistema de secreción tipo V.*
- *SST6: Sistema de secreción tipo VI.*
- *TLC: Cromatografía en capa fina.*



# RESUMEN

---



## Resumen en español

En el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa, los flavonoides secretados por las raíces activan un regulador transcripcional (proteína NodD) que por unión a unas secuencias promotoras conservadas en los rizobios (*nod*-box) activan la transcripción de los genes conocidos como genes de nodulación (o genes *nod*). Estos genes codifican para unas proteínas que están implicadas en la biosíntesis y secreción de una molécula de naturaleza lipoquitoligosacáridica conocida como factor de nodulación (o factor Nod). Este factor inicia una cascada regulatoria en la leguminosa que culmina con la formación de unas estructuras conocidas como nódulos en las raíces donde el rizobio se establecerá y fijará nitrógeno atmosférico hasta una forma utilizable por la planta. *Rhizobium tropici* CIAT 899 es una estirpe de rizobio que, además de tolerar diferentes estreses abióticos, sintetiza factores Nod bajo estrés salino. Así, en la presente Tesis Doctoral se ha estudiado la regulación de la síntesis de factores Nod en condiciones estresantes y no estresantes, y su implicación en el establecimiento de la simbiosis con diferentes leguminosas como *Phaseolus vulgaris*, *Leucaena leucocephala*, *Lotus japonicus* y *Lotus burtii*.

Para ello, se llevaron a cabo estudios transcriptómicos donde se observó que los genes de nodulación de CIAT 899 se inducen tanto en presencia del flavonoide apigenina como en condiciones de estrés osmótico, ya sea estrés iónico salino o estrés no iónico en presencia de manitol. A continuación, se buscó qué genes están implicados en las vías de síntesis de factores Nod bajo estrés osmótico. Así, por mutagénesis dirigida se determinó que el regulador NodD2 y un regulador perteneciente a la familia AraC son esenciales en la activación de los genes de nodulación y en la síntesis de factores Nod bajo estrés osmótico. Por otro lado, también se identificó a un regulador transcripcional NrcR que, aunque promovió la activación de los genes *nod* en presencia de apigenina y estrés salino, también reprimió el número de decoraciones que presentaron los factores Nod, además de afectar a otros fenotipos como movilidad de superficie y producción de exopolisacáridos. También se estudió el papel de las tres copias del gen *nodA* presentes en el genoma de este rizobio. Así, por mutagénesis dirigida por delección no polar se observó que NodA1 y NodA3 (este a pesar de que *nodA3* carece de *nod*-box)

son esenciales en la síntesis de factores Nod en presencia de apigenina y estrés salino, mientras que NodA2 por sí solo no es capaz de sintetizar estas moléculas en presencia de apigenina y solo lo hace ligeramente en presencia de estrés salino.

Por último, en cuanto a los fenotipos simbióticos de los mutantes obtenidos anteriormente, se observó que NodD1 es esencial para establecer simbiosis con *L. leucocephala* y *L. japonicus*, mientras que ambos NodD1 y NodD2 lo son en las otras dos leguminosas de estudio: *P. vulgaris* y *L. burttii*. Por otro lado, se observó que NodA1 o NodA3 por sí solos son suficientes para establecer simbiosis con todas las leguminosas ensayadas, mientras que NodA2 por sí solo no puede establecer simbiosis con *L. leucocephala* y *L. japonicus*.

Todos estos datos apuntan a que la activación de la síntesis de los factores Nod bajo estrés osmótico juega un papel en el establecimiento de la simbiosis con determinadas leguminosas. Futuros trabajos aportaran más datos acerca de este hecho.



## English abstract

In the establishment of the rhizobia-legume symbiosis, the flavonoids secreted by the plant roots activate a transcriptional regulator (NodD protein) that activates the transcription of the nodulation genes (known as *nod* genes) by binding to the rhizobia-conserved promoter sequences (*nod*-boxes). The *nod* genes encode for proteins that are involved in the biosynthesis and secretion of the Nodulation factors (also known as Nod factors). These Nod factors start a regulatory pathway in the legume that culminates in the formation of structures on the roots called nodules, where the established rhizobia will fix atmospheric nitrogen into a reduced form appropriate for the plant metabolism. *Rhizobium tropici* CIAT 899 is a rhizobial strain which tolerates different abiotic stresses and it is able to synthesize Nod factors under salt stress. Due to this fact, in this Thesis it has been studied the regulation of the synthesis of Nod factors under stressful and non-stressful conditions, and their involvement in the establishment of the symbiosis with different legumes including *Phaseolus vulgaris*, *Leucaena leucocephala*, *Lotus japonicus* and *Lotus burtii*.

To achieve this goal, ARNseq studies were carried out. Here, it was observed that the CIAT 899 *nod* genes are induced both in the presence flavonoid apigenin and under osmotic stress, either salt stress or non-ionic stress produced by mannitol. Then, it has been studied which genes are involved in the activation of the Nod factor synthesis pathway under osmotic stress. Thus, directed mutagenesis determined that NodD2 and a new regulator belonging to the AraC family are essentials in the activation of the *nod* genes and therefore in the synthesis of Nod factors under osmotic stress. On the other hand, a new transcriptional regulator NrcR was also identified. This protein promoted the activation of the *nod* genes in the presence of apigenin and salt stress but at the same time, it repressed the number of decorations of the Nod factors. Moreover, NrcR regulates other phenotypes such as surface motility and exopolysaccharides production. In addition, it has been also studied the role of the three copies of the *nodA* gene which are located in the genome of CIAT 899. Thus, non-polar deletion mutagenesis demonstrated that NodA1 and NodA3 (*nodA3* gene lacks *nod*-box upstream) were both required for the synthesis of Nod factors in the

presence of apigenin and salt stress, while NodA2 is not able to synthesize these molecules in the presence of apigenin but it does slightly under salt stress.

Finally, the symbiotic phenotypes of the mutants obtained before were studied. Here, it was observed that NodD1 is essential to establish symbiosis with *L. leucocephala* and *L. japonicus*, while both NodD1 and NodD2 are necessary for the establishment of the symbiosis in the other two legumes of this study: *P. vulgaris* and *L. burttii*. In addition, the presence of NodA1 or NodA3 is sufficient to establish symbiosis with all the legumes tested, while NodA2 by itself does not nodulate *L. leucocephala* and *L. japonicus*.

All these data indicate that the activation of the synthesis of the Nod factors under osmotic stress plays a role in the establishment of the symbiosis with certain legumes. Future jobs will provide more information about this fact.

# INTRODUCCIÓN

---



## La simbiosis rizobio-leguminosa

### Antecedentes

En la actualidad, nuestra sociedad se enfrenta al reto de satisfacer la demanda alimentaria de una población mundial en continuo aumento. Hoy día esta población es de 7600 millones de habitantes, y se estima que en 2030 habrá 8600 millones, que pasarán a ser 9800 millones en 2050. Por esto, la disponibilidad de nitrógeno es fundamental para la alimentación mundial y la aplicación de fertilizantes nitrogenados, que requiere un elevado consumo energético, contribuye a la amenaza creciente del efecto invernadero y del cambio climático. En este contexto, la fijación biológica del nitrógeno (FBN) es una de las claves para romper la dependencia del uso de fertilizantes nitrogenados. La FBN la realizan microorganismos procariotas en vida libre o mediante el establecimiento de relaciones simbióticas con algunas plantas de la familia *Fabaceae* (leguminosas). Las leguminosas representan una de las fuentes más importantes de proteína vegetal para los seres humanos y la alimentación animal en todo el mundo. Por lo tanto, entender cómo las leguminosas establecen interacciones simbióticas que les permitan crecer sin añadir abonos nitrogenados a los cultivos es una cuestión esencial para mantener un alto rendimiento de los cultivos y una buena seguridad alimentaria de manera sostenible.

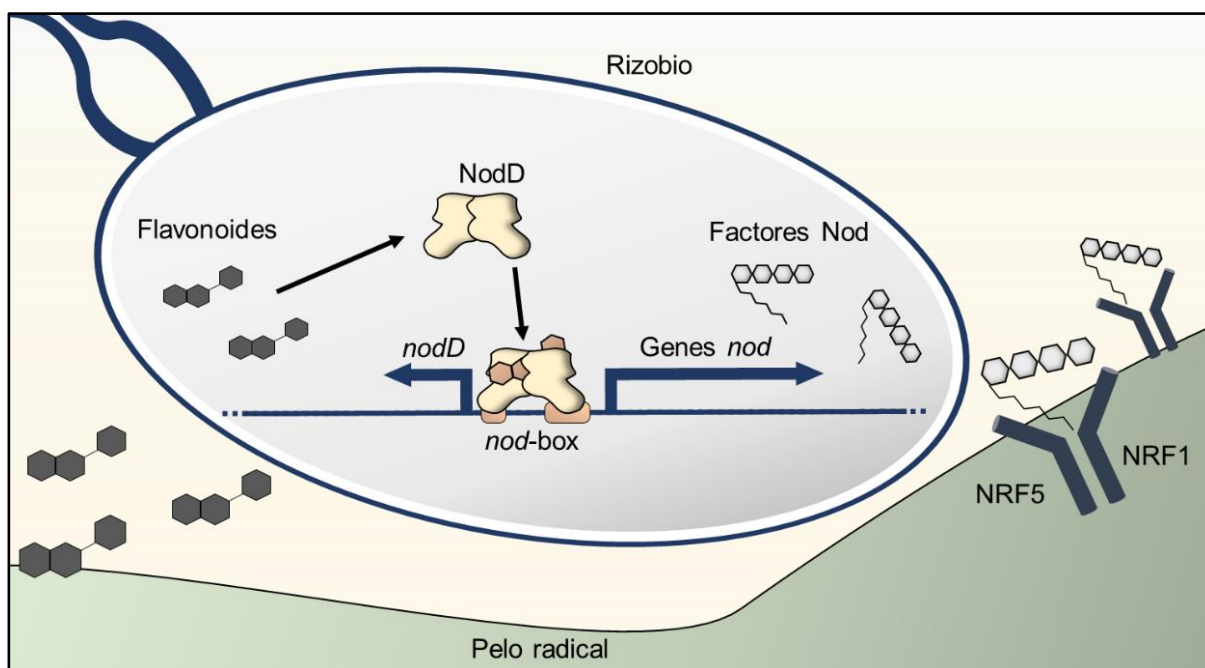
Cada vez está más claro que para mejorar el rendimiento de los cultivos se debe tener en cuenta la interacción de todos sus componentes, es decir, las interacciones entre las plantas, el suelo, los microbios, los insectos y el clima, conocidas colectivamente como fitobioma (Müller *et al.*, 2016). Las plantas pueden reconocer moléculas sintetizadas por los distintos organismos presentes en su entorno, que pueden desembocar en relaciones mutualistas (simbióticas) o en una respuesta inmune por parte de la planta (patógenas) (Cook *et al.*, 2015). El establecimiento de asociaciones simbióticas está restringido a pocas especies de bacterias y hongos. La más extendida (presente en la mayoría de las plantas terrestres) y evolutivamente más antigua es la simbiosis entre los hongos micorrícicos, pertenecientes al Filo *Glomeromycota*, y las plantas. Gracias a esta relación simbiótica, el hongo suministra o facilita a la planta

ciertos nutrientes, entre los que destaca el fósforo (Oldroyd, 2013). Además, como se ha mencionado anteriormente, algunas plantas de la familia de las leguminosas han desarrollado una simbiosis, generalmente radicular y a nivel intracelular, con bacterias fijadoras de nitrógeno denominadas colectivamente rizobios. Por otra parte, el actinomiceto *Frankia* induce la formación de unas estructuras nodulares fijadoras de nitrógeno en plantas actinorrícicas como son los miembros de los géneros de árboles *Alnus* o *Casuarina* (Oldroyd, 2013). También existen otras asociaciones simbióticas en las plantas, pero en la mayoría de los casos los mecanismos de señalización para llevarlas a cabo son desconocidos.

## El establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa

Las leguminosas establecen simbiosis con un grupo de bacterias del suelo conocidas como rizobios. Este proceso simbiótico es muy específico y comienza con la secreción por la raíz de las leguminosas de unos metabolitos secundarios conocidos como flavonoides que actúan como atrayentes químicos de los rizobios. La presencia de estos flavonoides activa a un regulador transcripcional constitutivo codificado por el gen *nodD*, que por medio de la unión a un promotor conservado denominado caja *nod* o *nod-box* (NB), induce la expresión de un grupo de genes conocido como genes de nodulación o genes *nod* (Mulligan y Long, 1985) (**Figura 1**).

Los genes *nod* codifican para unas proteínas encargadas de sintetizar y secretar unos compuestos conocidos como factores de nodulación o factores Nod (FN) (Dénarié *et al.*, 1996). Estas moléculas de naturaleza lipoquitooligosacáridica son reconocidas por unos receptores específicos en la raíz, iniciando una cascada regulatoria en la célula vegetal. Los componentes que regulan esta ruta de señalización se han descrito principalmente en las leguminosas modelo de estudio *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus*.

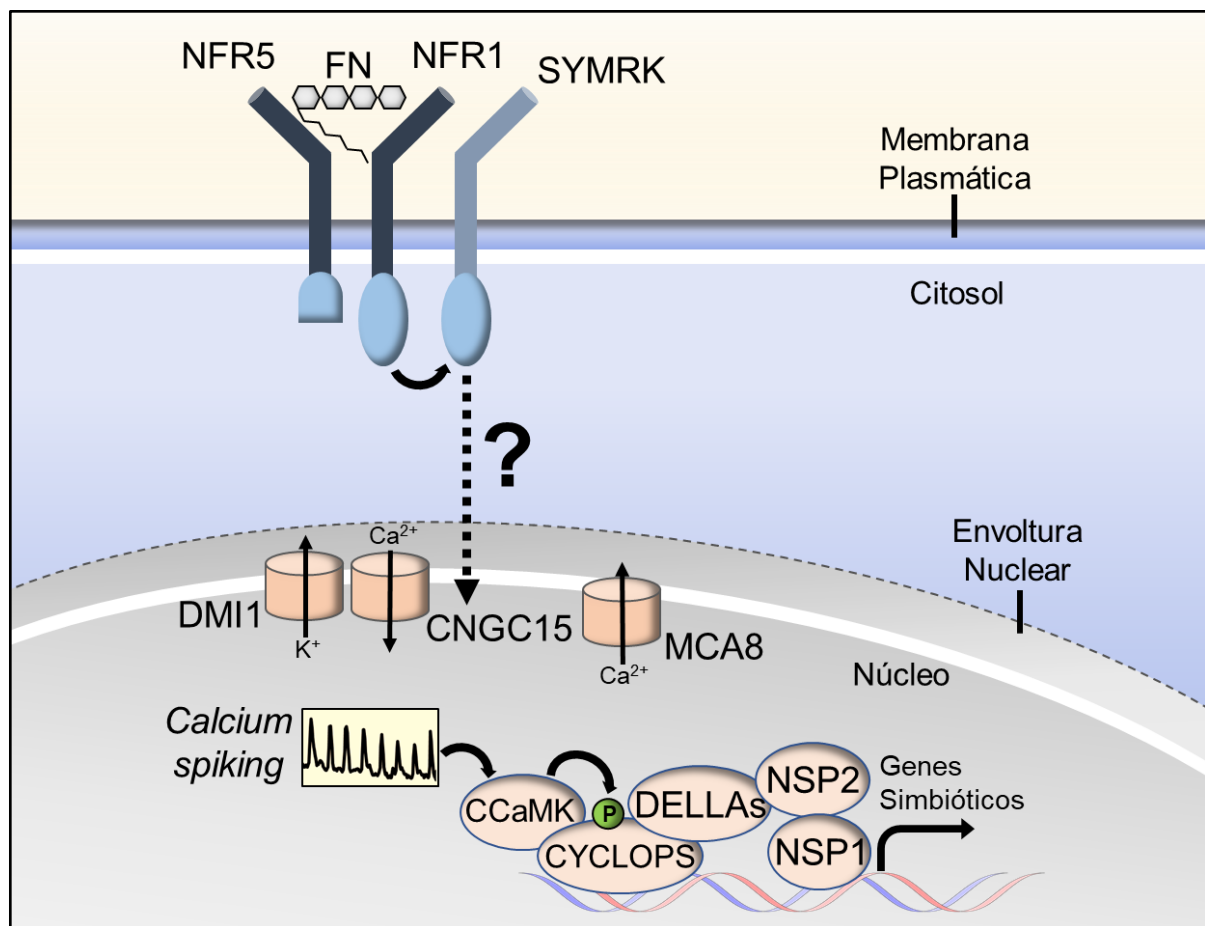


**Figura 1 – Esquema de la regulación de la síntesis de los FN en los rizobios. Las flechas negras representan activación descrita.**

En *L. japonicus*, la percepción de los FN se lleva a cabo por la unión a dos receptores LysM (NFR1 y NFR5) junto a un receptor con dominio LRR-quinasa (SYMRK), que inician una cascada regulatoria, hasta la fecha desconocida, que transmite la señal al núcleo de la planta (**Figura 2**) (Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003; Madsen *et al.*, 2010; Broghammer *et al.*, 2012). En el núcleo, esta señalización genera unas oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  gracias a la acción conjunta del complejo de canales POLLUX (DMI1 en *M. truncatula*), CNGC15 y CASTOR (MCA8 en *M. truncatula*) (Charpentier *et al.*, 2008; Charpentier *et al.*, 2016). Estas señales son decodificadas directamente por el complejo proteico CCAMK y CYCLOPS, que transfieren la señal a través de diferentes factores de transcripción (NSP1, NSP2 y DELLAs), iniciándose la transcripción de los genes de la planta responsables de la formación de los nódulos (genes *NIN* y *ENOD*, entre otros) (Kaló *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 2005; Oldroyd y Downie, 2008; Yano *et al.*, 2008; Singh y Parniske, 2012; Miller *et al.*, 2013).

Los nódulos pueden presentar diferentes morfologías según la planta hospedadora. Por un lado, los que tienen morfología esférica se denominan nódulos determinados, como son los de *L. japonicus*, *Phaseolus vulgaris* (judía) o *Glycine max* (soja). Mientras, los que tienen morfología cilíndrica se denominan indeterminados y son

típicos en *M. truncatula* o *Leucaena leucocephala* (Leucena). En los nódulos indeterminados, el primordio se origina en el córtex interno de la raíz y da lugar a un meristemo apical persistente, de modo que continuamente se generan nuevas células que van siendo infectadas, por lo que el nódulo adopta la forma cilíndrica (Ferguson *et al.*, 2010). El primordio de los nódulos determinados se origina en el córtex externo y da lugar a un meristemo cuya actividad es transitoria, de modo que genera una masa esférica de células que se diferenciarán a la vez (Ferguson *et al.*, 2010). Algunos autores han sugerido la existencia de otros tres tipos de nódulos: nódulos de tipo dalbergioide, nódulos indeterminados con gradiente de edad y un meristemo, y nódulos indeterminados con gradiente de edad y dos meristemos (Sprent, 2007).



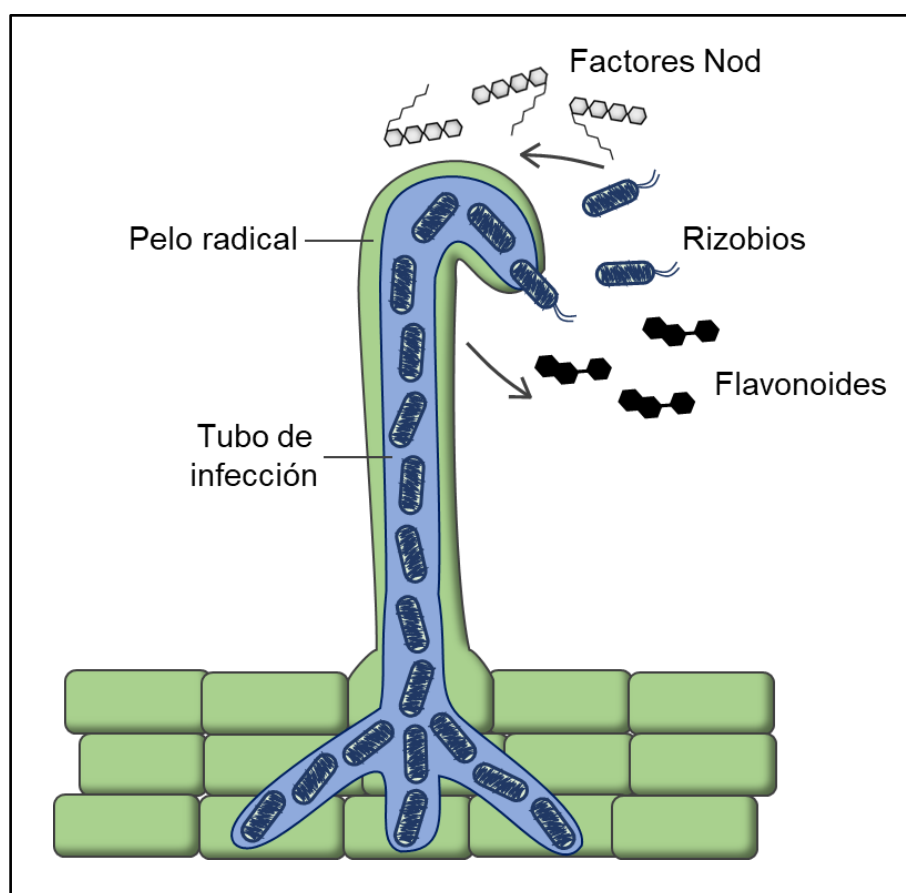
**Figura 2 – Esquema de la cascada regulatoria activada por la recepción del FN en el pelo radical. La flecha discontinua indica que la activación podría ser directa o indirecta.**

Recientemente, se ha observado que las fitohormonas también desempeñan un papel importante durante la infección del rizobio y la formación de los nódulos.



Concretamente, se ha comprobado que las citoquininas en *L. japonicus* y *M. truncatula* son importantes para el inicio de la formación de los nódulos, la regulación de la infección del rizobio y la determinación del número de nódulos (Gamas *et al.*, 2017). Esta regulación ocurre por cambios en los niveles de las hormonas vegetales, que pueden ser provocados por la planta en respuesta a la señalización del FN o bien por la síntesis directa de estas fitohormonas por parte de los rizobios (Ferguson y Mathesius, 2014).

Por lo tanto, la simbiosis rizobio-leguminosa se inicia por un complejo intercambio de señales. A continuación, los rizobios se adhieren a los pelos radicales, que se deforman y curvan en respuesta a los FN permitiendo la formación de un canal o tubo de infección en el interior del pelo radical por donde los rizobios entran hasta el córtex radicular (Oldroyd *et al.*, 2011) (**Figura 3**).



**Figura 3 – Esquema de la colonización de la raíz de la leguminosa por parte de los rizobios.**

Una vez en el interior de la célula vegetal, el rizobio se endocita rodeándose por una membrana de origen vegetal (la membrana peribacteroidea) dando lugar a una estructura, que se asemeja a un orgánulo, al que se le denomina simbiosoma (Udvardi y Poole, 2013). Dentro de este simbiosoma, las bacterias se diferencian en bacteroides. Estos bacteroides reducen el nitrógeno atmosférico a amonio por la acción del complejo enzimático denominado nitrogenasa. No obstante, en algunas leguminosas que pertenecen al clado IRLC (del inglés *Inverted Repeat Lacking Clade*) se han identificado unos genes que codifican para una familia de péptidos ricos en cisteínas denominados NCR (del inglés *Nodule specific Cysteine-Rich*) que regulan la diferenciación del bacteroide controlando que solo ciertos rizobios puedan hacerlo y, por tanto, actúan como un punto de control adicional en la especificidad de la simbiosis (Kereszt *et al.*, 2018). Este tipo de péptidos solo se han identificado en las leguminosas del clado IRLC como *Medicago*, *Pisum* o *Trifolium*. No obstante, se piensa que en el resto de las leguminosas también podría haber algún tipo de selección, pudiendo ser incluso las propias condiciones abióticas presentes en el nódulo (estrés osmótico, pH, entre otros) (Green *et al.*, 2019).

## Los genes de nodulación

En los rizobios, los genes esenciales para la nodulación, infección y fijación de nitrógeno están normalmente agrupados en operones. Los genes de nodulación o genes *nod* están implicados en la síntesis, procesamiento y transporte de los FN, siendo los genes más conservados en los rizobios los denominados genes *nod* comunes que incluyen a los genes *nodABCDIJ* (Remigi *et al.*, 2015). Inicialmente, se denominaron genes *nod*, pero la continua descripción de nuevos genes de nodulación hizo necesaria la utilización de las designaciones de genes *nol* y genes *noe*. En la mayoría de los rizobios se localizan en un plásmido de tamaño variable llamado plásmido simbiótico o pSym. Pero en algunas especies, como *Bradyrhizobium japonicum* o *Mesorhizobium loti*, los genes de nodulación se agrupan en islas simbióticas en el cromosoma de la bacteria (Downie, 1998).

De todos los genes *nod*, los genes *nodABC* están presente en casi todas las especies de rizobios ya que son los encargados de sintetizar la estructura básica o núcleo del FN (Spaink *et al.*, 1991). En el proceso de síntesis, la proteína NodC (*N*-acetilglucosamina transferasa) se encarga de sintetizar el esqueleto del FN, que está formado por moléculas de *N*-acetilglucosamina (NAcGlu), y también determina su longitud (Geremia *et al.*, 1994). El siguiente paso en la síntesis es llevado a cabo por NodB que codifica una quitina desacetilasa, que desacetila uno de los residuos de NAcGlu extremo no reductor de la cadena, que posteriormente es acilado por la proteína NodA (John *et al.*, 1993; Atkinson *et al.*, 1994). En la siguiente **Tabla 1** se muestran las funciones de los genes de nodulación más comunes, entre las que destacan la decoración de los FN, tales como la adición de grupos de azufre o de grupos metilo, y el transporte de estos factores al exterior (Downie, 1998).

**Tabla 1 – Funciones de algunos genes *nod* presentes en los rizobios.**

Gen	Función de la proteína a la que codifica
<i>nodA</i>	Aciltransferasa
<i>nodB</i>	Quitina desacetilasa
<i>nodC</i>	NAcGlu transferasa
<i>nodD</i>	Regulador transcripcional de genes <i>nod</i>
<i>nodEF</i>	Síntesis de ácidos grasos poliinsaturados
<i>nodH</i>	Sulfotransferasa
<i>nodIJ, nodT</i>	Exportación del FN
<i>nodL, nodX, nolL</i>	O-acetiltransferasa
<i>nodM</i>	Glucosamina sintasa
<i>nodPQ</i>	Síntesis de sulfato en forma activa
<i>nodS</i>	N-metiltransferasa
<i>nodU, nolO</i>	O-carbamoil transferasa
<i>nodZ</i>	Fucosil transferasa
<i>nolK</i>	Epimerasa implicada en la síntesis de fucosa
<i>nolR</i>	Represor de genes <i>nod</i>

Información obtenida de Perret *et al.*, 2000; Vance, 2002.

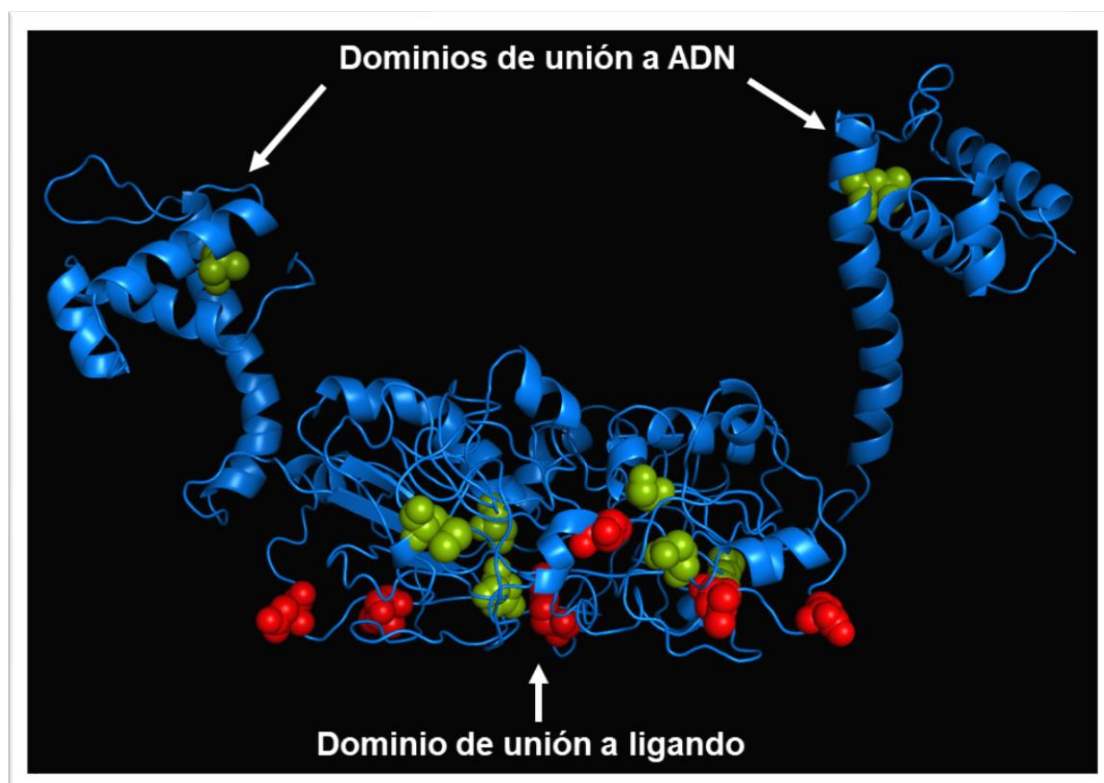
## El regulador transcripcional NodD

El gen *nodD* es uno de los genes de nodulación más importantes ya que codifica para el regulador transcripcional que activa (a veces reprime) a los genes *nod* en presencia del flavonoide apropiado. Este regulador, perteneciente a la familia proteica LysR, se transcribe de forma constitutiva y en presencia del flavonoide adecuado, cambia su conformación a activa para unirse a las NB activando o reprimiendo la expresión de los operones de los genes *nod* o de genes relacionados con la simbiosis que se encuentren aguas abajo (Fellay *et al.*, 1998; Peck *et al.*, 2006; Long, 2016).

Los rizobios suelen poseer una o dos copias del gen *nodD*, aunque algunos rizobios portan hasta cinco copias del gen *nodD* en su genoma, lo que podría estar relacionado con un mayor rango de nodulación (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012). En cuanto a su estructura, la proteína NodD no ha conseguido ser cristalografiada de momento. No obstante, estudios de mutagénesis puntuales y aproximaciones bioinformáticas a partir de la cristalografía de otras proteínas similares indican que NodD podría formar homodímeros o heterodímeros, donde existe una región de unión al inductor (en este caso el flavonoide) y otra región de unión al ADN (HTH, del inglés *Helix-Turn-Helix*) y a la ARN polimerasa (**Figura 4**) (Peck *et al.*, 2013).

Además, hay otros puntos importantes que hay que tener en cuenta en la activación y función de NodD. Por un lado, este regulador transcripcional no siempre tiene un papel activador de la expresión de los genes *nod*, ya que en *Sinorhizobium* (= *Ensifer*) *fredii* NGR234, NodD2 actúa como represor de los genes *nod* (Fellay *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 2004). En *S. fredii* USDA257 y USDA191, la sobreexpresión de *nodD2* reduce la transcripción de *nodD1* (Machado *et al.*, 1998). Además, en *S. fredii* HH103, la mutación de *nodD2* provoca que la bacteria sintetice FN con un mayor número de decoraciones lo que permite a este rizobio establecer simbiosis efectiva en *L. japonicus*, algo que no ocurre en la estirpe silvestre que tan solo forma primordios nodulares (Acosta-Jurado *et al.*, 2019). Por otro lado, no existen evidencias bioquímicas que determinen la interacción del flavonoide con la proteína NodD, lo que podría abrir la puerta a que otros componentes pudieran intervenir en la activación de

NodD, y, por tanto, en la regulación de los genes *nod*. De hecho, no se ha descrito aún un flavonoide activador de NodD en *M. loti*, simbionte modelo en *L. japonicus* (Kelly *et al.*, 2018a), lo que sugiere que la activación de NodD podría ser más compleja de lo que se conoce hasta la fecha.



**Figura 4 – Modelo estructural del dímero de NodD1 de *S. meliloti* (Peck *et al.*, 2013). Esta imagen ha sido cedida por Roger Castells (John Innes Centre, Norwich, Reino Unido).**

## Otros reguladores transcripcionales de interés

### *Reguladores de la familia ArsR: NodR*

Otro grupo importante de reguladores transcripcionales que están implicados en mayor o menor medida en la efectividad de la simbiosis entre rizobios y leguminosas son las proteínas de unión a metales. En estos reguladores, la unión de iones metálicos altera la conformación alostérica de la proteína y, por tanto, permite modular la expresión de aquellos genes diana. La familia de reguladores ArsR es una de las más importantes en bacterias por el número de reguladores transcripcionales que

contiene. En esta familia, hay tanto activadores como represores y estos reguladores se han descrito también en varias especies de rizobios (Shi *et al.*, 1994; Kiss *et al.*, 1998; Osman y Cavet, 2010). Un miembro de esta familia bien caracterizado es la proteína NolR, descrita originalmente como un represor general del regulador *nodD1* y del operón *nodABC* en *S. meliloti* (Kondorosi *et al.*, 1989; Kondorosi *et al.*, 1991; Cren *et al.*, 1995). Se ha propuesto un modelo que explica cómo NolR reprime a los genes *nod*, donde NolR reconocería ciertas regiones promotoras de las *nod*-box, lo que alteraría la asociación de NodD y por tanto impediría la transcripción de los genes *nod* (Lee *et al.*, 2014). Además, NolR regula otros procesos bacterianos puesto que en *S. fredii* HH103, la mutación en el gen *nolR* genera cambios en la decoración de los FN y en la producción de exopolisacáridos (EPS) (Vinardell *et al.*, 2004a). En otras estirpes como en *S. medicae*, NolR reprime la expresión de *nodC* y la ausencia de este represor provoca una mayor competitividad y una mayor eficacia en la nodulación en *Medicago sativa* (Sugawara y Sadowsky, 2014).

### *Reguladores de la familia AraC*

La familia de reguladores transcripcionales AraC constituye otro de los grupos más numerosos e importantes de proteínas reguladoras en bacterias (Yang *et al.*, 2011). Esta familia de proteínas se encarga de la regulación transcripcional de una variedad de procesos celulares en bacterias Gramnegativas y Grampositivas, incluyendo el metabolismo del carbono, las respuestas al estrés y la virulencia de bacterias patógenas (Gallegos *et al.*, 1997). En general, estos reguladores tienen un tamaño entre 200 y 300 aminoácidos donde se diferencian dos dominios: un dominio conservado de unión a ADN (HTH) en el extremo C-terminal y un dominio variable N-terminal. En muchos casos, el dominio N-terminal es responsable tanto de la dimerización de la proteína como de la unión a ligando (Gallegos *et al.*, 1997; Martin y Rosner, 2001). Se ha propuesto un modelo general para explicar cómo esta familia de reguladores actúa en base a la transición de la represión a la activación del promotor que regula al operón *araBAD* en respuesta a su efector, en este caso arabinosa. Así, según este modelo, cuando la arabinosa está ausente, un dímero de AraC se une a secuencias específicas del ADN, lo que conlleva a la represión del operón *araBAD*, responsable del catabolismo del azúcar. En cambio, en presencia de

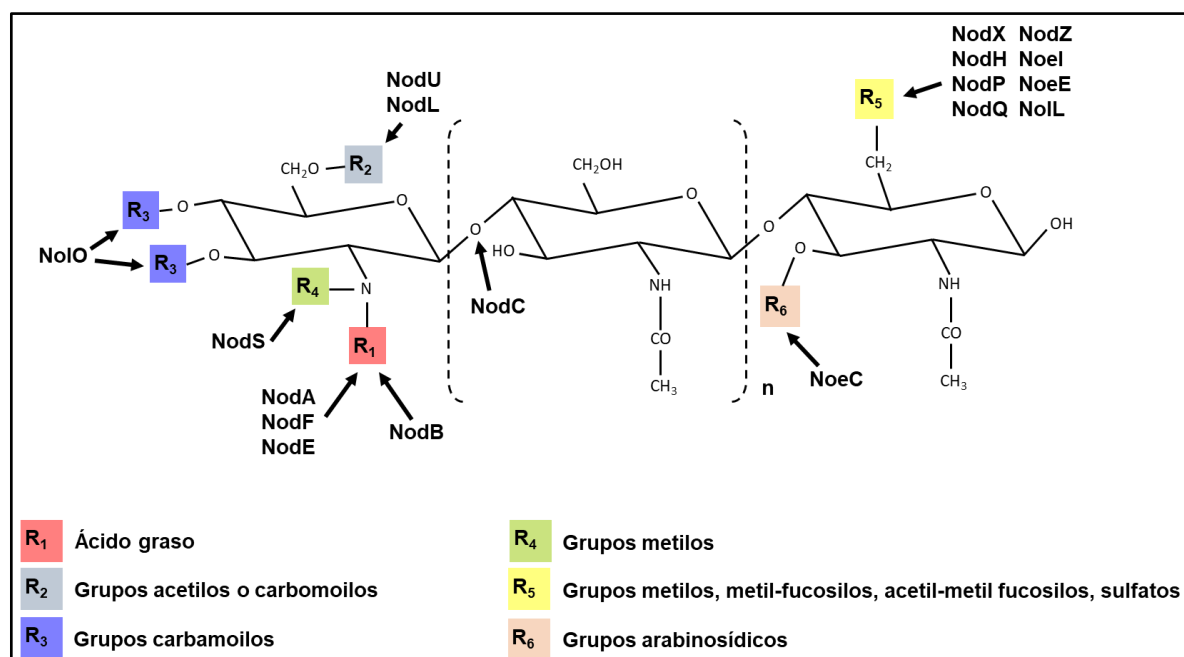
arabinosa, el dímero de AraC unido al ADN sufre un cambio alostérico de manera que cambia la forma en la que se une al ADN conduciendo a la activación transcripcional del operón (Gallegos *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2009; Lowden *et al.*, 2010).

Hasta la fecha, no se ha descrito un regulador de la familia AraC que esté implicado en la simbiosis rizobio-leguminosa. No obstante, en los genomas de los rizobios secuenciados se ha observado la presencia de este tipo de reguladores transcripcionales, como por ejemplo en la estirpe *Rhizobium tropici* CIAT 899, que presenta en su genoma hasta 21 reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia AraC, cuatro de ellos localizados en el plásmido simbiótico (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012).

## Los factores de nodulación (FN)

Tal y como se comentó anteriormente, los FN son lipoquitooligosacáridos producidos por los rizobios en respuesta a la señal liberada por la planta, los flavonoides, para iniciar el proceso de nodulación en la leguminosa hospedadora (Mergaert *et al.*, 1997). Todos los FN caracterizados tienen una estructura básica común que consiste en un esqueleto oligomérico de 3-6 unidades de NAcGlu unidas por un enlace  $\beta$ -(1,4), que lleva unido un ácido graso al nitrógeno del extremo no reductor (Spaink, 2000). La estructura básica del FN suele estar modificada por distintos radicales de naturaleza variable tanto en el extremo reductor como en el no reductor de la molécula (**Figura 5**). Los grupos N-metilo, O-acetilo y O-carbamoilo son los que más comúnmente aparecen modificando el extremo no reductor de las moléculas. En cambio, los grupos fucosilo, 2-O-metil-fucosilo, 4-O-acetil-metil-fucosilo, acetilo y sulfato son las sustituciones más frecuentes en el extremo reductor (Broughton *et al.*, 2000; Perret *et al.*, 2000). La **Figura 5** muestra la estructura general básica de los FN producidos por los rizobios, así como sus sustituyentes más comunes y los genes *nod* implicados en su síntesis.





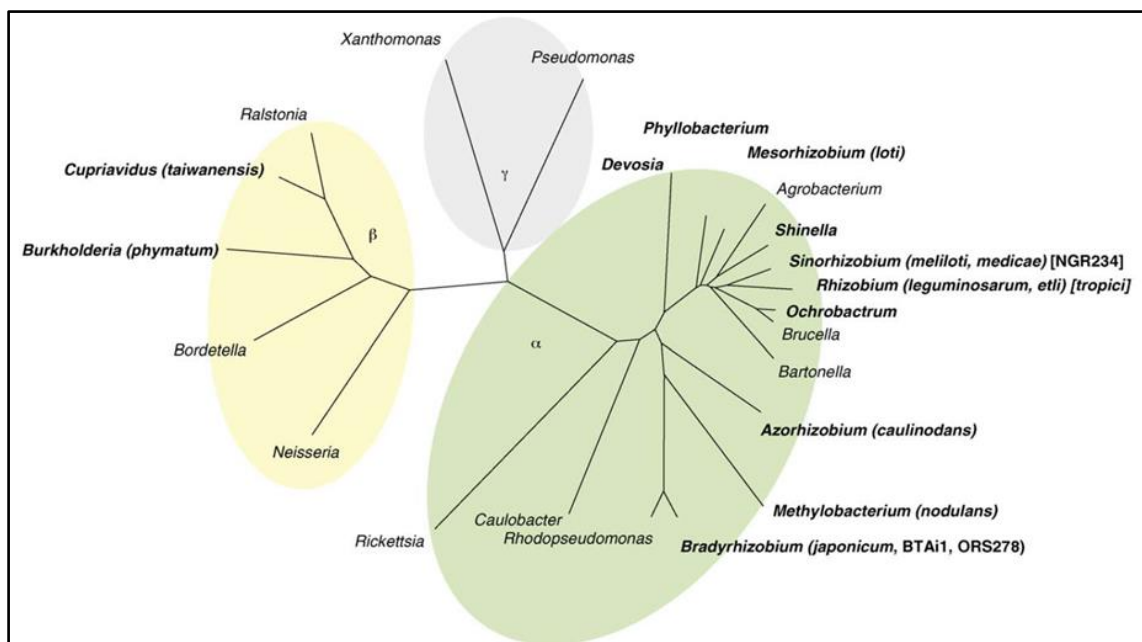
**Figura 5 – Estructura de los FN y sus decoraciones descritas. También se muestran las proteínas que llevan a cabo la síntesis y las decoraciones del FN. Figura adaptada de Perret et al., 2000.**

## Filogenia

En cuanto a la filogenia de los diferentes rizobios, uno de los estudios más completos se llevó a cabo por Masson-Boivin *et al.* (2009). En este estudio, mediante la comparación de las secuencias del ARNr 16S, se muestra que los rizobios se distribuyen en hasta 12 géneros diferentes en las clases  $\alpha$ - y  $\beta$ -proteobacteria (**Figura 6**). Es interesante reseñar que no suele haber una correlación estricta entre la leguminosa con la que un rizobio nodula y su taxonomía bacteriana. Mientras que todos los rizobios de la clase  $\alpha$ -proteobacteria pertenecen al orden *Rhizobiales*, los rizobios de la clase  $\beta$ -proteobacteria pertenecen al orden *Burkholderiales*. En ocasiones, algunos géneros o incluso especies pueden contener estirpes que pertenecen a los *Rhizobiales* y otras que no lo son, como por ejemplo en el género *Methylobacterium*, donde se encuentra *M. nodulans*, que induce nódulos fijadores de nitrógeno en distintas especies de *Crotolaria*. Por otro lado, *Cupriavidus taiwanensis* se puede aislar tanto de nódulos de *Mimosa pudica* como de muestras clínicas. Este tipo de casos genera confusión en la comunidad científica y a su vez indica que la adquisición del estilo de vida simbiótico podría haber ocurrido de forma repetida e independiente a través de transferencia horizontal de genes con funciones claves en



la simbiosis (genes de nodulación o de fijación de nitrógeno), convirtiendo bacterias de vida libre presentes en el suelo en bacterias simbióticas (Martínez-Romero, 2009).



**Figura 6 – Árbol filogenético a partir de las secuencias del ARNr 16S. Los géneros en negrita contienen especies de rizobios. Los paréntesis y corchetes indican que el genoma ha sido secuenciado. Figura tomada de Masson-Boivin et al. (2009).**

En los últimos años se han realizado algunas modificaciones en la taxonomía rizobiana. Una de las más controvertidas en la comunidad científica ha sido la del cambio de nombre del género *Sinorhizobium* a *Ensifer*, el cual cuenta con hasta 17 especies en la actualidad (Weir, 2016). Por comodidad y tradición, a lo largo de esta Tesis se nombrarán a las bacterias pertenecientes al género *Ensifer* como *Sinorhizobium*. Otra modificación importante es la aparición del género *Microvirga*, del que se han identificado hasta tres especies de momento (Weir, 2016).

## Otros factores relevantes en la simbiosis rizobio-leguminosa

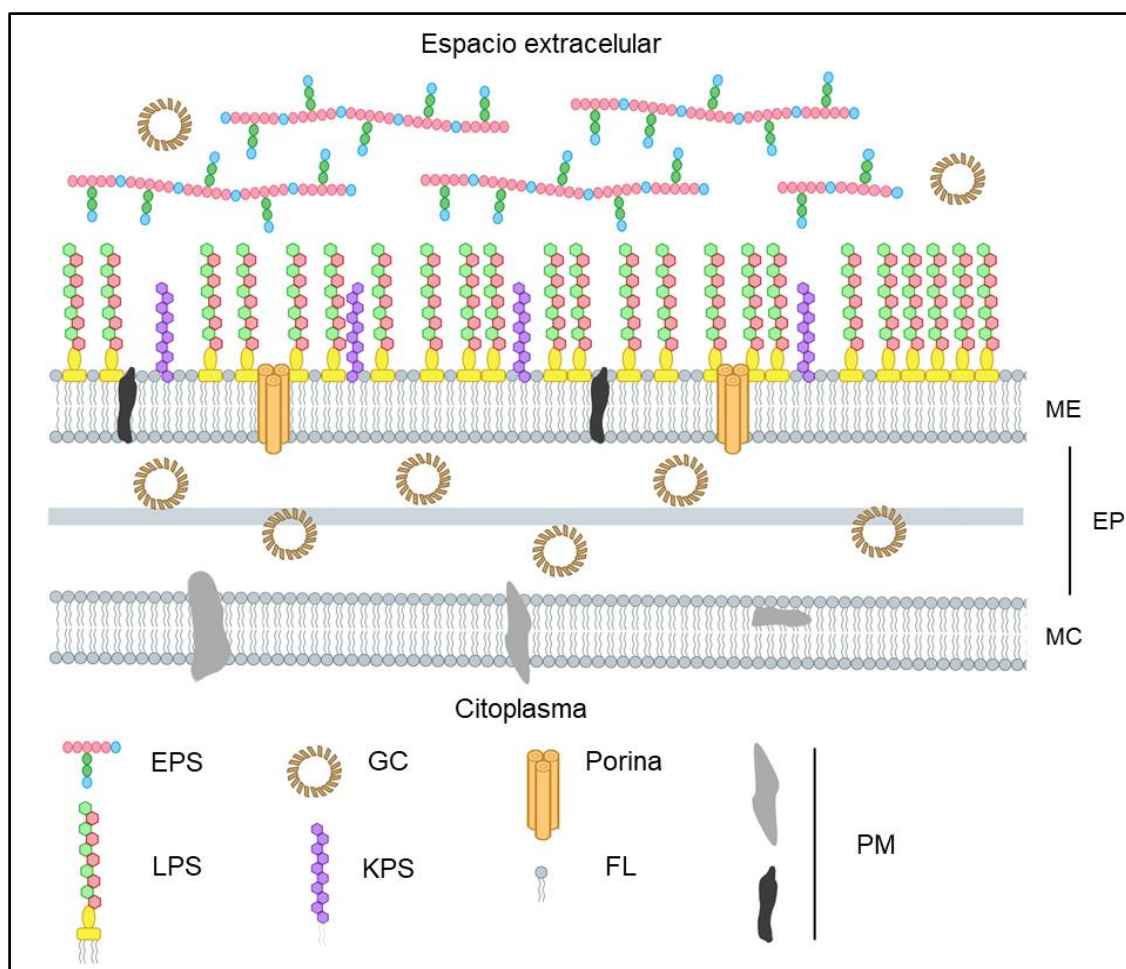
### *Polisacáridos de superficie*

Durante la colonización de los rizobios a través de los tubos de infección, además de los FN, otras moléculas producidas por los rizobios como los polisacáridos de

superficie juegan un papel esencial en la interacción simbiótica (Parada *et al.*, 2006; Gibson *et al.*, 2008; Crespo-Rivas *et al.*, 2009; Downie, 2010; Margaret-Oliver *et al.*, 2012). Estos polisacáridos actúan como señales requeridas para la progresión de la interacción. De hecho, recientemente se ha descrito en *L. japonicus* un receptor (EPR3) que reconoce a los EPS *M. loti*, y este reconocimiento es esencial para la progresión del rizobio por el tubo de infección, lo que determina un nuevo punto de control en la compatibilidad rizobio-leguminosa (Kawaharada *et al.*, 2015).

En los rizobios se han observado diferentes tipos de polisacáridos superficiales. Los más relevantes son: el EPS, el lipopolisacárido (LPS), el polisacárido capsular de tipo antígeno-K (KPS), los glucanos cíclicos (GC), el polisacárido neutral o glucomanano (NP), el polisacárido formador de gel (GPS) y las fibrillas de celulosa (Janczarek *et al.*, 2015). A pesar de esta gran variedad, los cuatro polisacáridos mejor descritos y más distribuidos entre los rizobios son EPS, GC, LPS y KPS (**Figura 7**) (López-Baena *et al.*, 2016). La localización de estos polisacáridos es variada: El EPS se localiza en el exterior de la célula sin unión o con una ligera asociación a la membrana externa, los GC se encuentran en el espacio periplásmico o extracelular, mientras que el LPS y el KPS son constituyentes de la membrana externa (**Figura 7**).

Entre las funciones más relevantes durante la simbiosis de estos polisacáridos se encuentra la unión a las raíces, reconocimiento del hospedador, formación del tubo de infección e invasión de los nódulos. De hecho, en *S. fredii* HH103 los LPS y los GC son relevantes en la simbiosis de este rizobio con *L. burtii* (Acosta-Jurado *et al.*, 2016a), mientras que en *S. meliloti* los EPS son esenciales en la simbiosis con *M. truncatula* (Janczarek, 2011).



**Figura 7 - Esquema de la superficie rizobiana en la que se muestra la disposición de los polisacáridos superficiales. ME: Membrana externa; EP: Espacio periplásmico; MC: Membrana citoplasmática; EPS: Exopolisacáridos; GC: Glucanos cíclicos; LPS: Lipopolisacáridos; KPS: Polisacárido capsular de tipo antígeno-K; FL: Fosfolípidos; PM: Proteínas de membrana. Figura tomada de Vinardell *et al.*, 2005.**

### *Formación de biopelículas*

En la rizosfera, generalmente los rizobios se agrupan formando comunidades bacterianas rodeadas de una matriz producida por las propias bacterias, quedando unidas de forma reversible a la superficie de la raíz. A este tipo de agrupación celular se le denomina biopelículas o en inglés *biofilm* (Costerton *et al.*, 1995). Tras la unión a la superficie de la raíz, los rizobios se dividen y la comunidad bacteriana adquiere una estructura tridimensional que, en algunos casos, puede llegar a poseer canales internos a través de los cuales las bacterias obtienen agua y nutrientes, producen ciertas enzimas y señales moleculares, o excretan productos tóxicos (Stanley y Lazazzera, 2004).

Normalmente, las biopelículas están compuestas por agua, iones, células y una matriz de EPS (Sutherland, 2001), lo que proporciona una barrera contra la difusión de compuestos como antibióticos y sustancias de defensa producidos por los hospedadores, y contra el estrés ante factores ambientales como radiación, cambios de pH, estrés osmótico y desecación (Gilbert *et al.*, 1997; Janczarek, 2011). Otros componentes bacterianos, tales como los flagelos y los LPS, juegan también un papel esencial en la formación de estas biopelículas (Rinaudi y Giordano, 2010).

En la rizosfera, muchos de los rizobios forman biopelículas cuando colonizan la raíz. Hasta la fecha, no se conoce con exactitud los mecanismos por los que se forma una biopelícula en los rizobios, aunque se van descubriendo factores que son necesarios para la formación de ésta. De hecho, se ha observado en *S. meliloti* que los propios FN pueden formar parte de la matriz de la biopelícula, siendo esenciales para la formación de la estructura tridimensional de la misma, necesaria para el establecimiento de la interacción simbiótica (Fujishige *et al.*, 2006). Otro estudio reciente en *S. fredii* SMH12 muestra que la formación de biopelículas es crucial para una óptima colonización de raíz, y por tanto, para el establecimiento de la simbiosis en *G. max* (Pérez-Montaña *et al.*, 2014). En ambos estudios, la formación de estas biopelículas está regulada por flavonoides inductores de los genes *nod*.

### *Percepción de quórum o quorum sensing (QS)*

El proceso por el que las bacterias cambian su expresión génica de manera coordinada en respuesta a cambios en la densidad de población se conoce como *quorum sensing* (QS). En este proceso intervienen unas moléculas señal que difunden fácilmente por la membrana llamadas autoinductores (Fuqua *et al.*, 1994; Miller y Bassler, 2001). En bacterias Gramnegativas, los principales autoinductores se han identificado como *N*-acil-homoserina lactonas (AHL) y su producción se ha detectado también en bacterias asociadas a plantas, incluidos los rizobios (Cha *et al.*, 1998). Los genes regulados por QS están implicados en cambios adaptativos en la fisiología de las poblaciones bacterianas, adaptando y modificando su comportamiento cuando se alcanza una cierta densidad celular (Calatrava-Morales *et al.*, 2018). Así, los genes

controlados por QS modulan una amplia variedad de fenotipos: virulencia, transferencia de plásmidos, producción de toxinas, inhibición del crecimiento, formación de biopelículas, producción de EPS, movilidad, eficiencia en la nodulación, desarrollo del simbiosoma y fijación de nitrógeno, que son relevantes para el establecimiento de la simbiosis o para la relación patogénica con hospedadores eucariotas (Fuqua *et al.*, 1994; Pérez-Montaña *et al.*, 2011 y 2013).

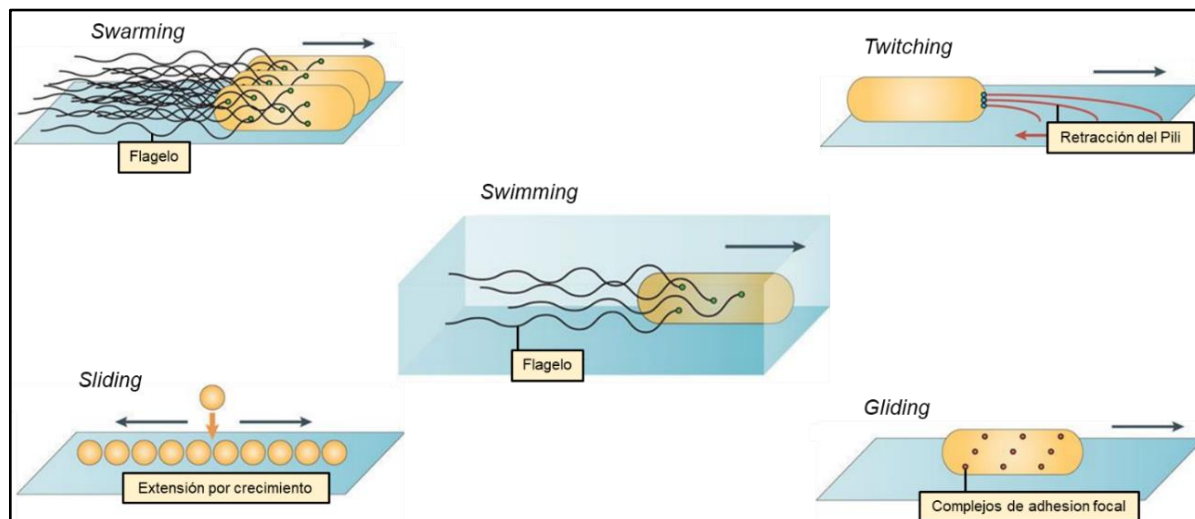
Curiosamente, los procesos de QS son relevantes tanto en comunicación intraespecífica como en interespecífica, como el que ocurre entre *B. japonicum* y *A. brasilense* donde la co-inoculación de estas dos estirpes en *G. max* incrementa la biomasa de esta leguminosa, y todo ello por los procesos de QS que se dan entre ambas estirpes, ya que la ausencia de las AHL no produce este incremento afectando además al crecimiento bacteriano y la formación de biopelículas (Fagotti *et al.*, 2019)

### *Movilidad bacteriana*

Otro proceso conservado y extendido en las bacterias es la movilidad que les permite mayor eficacia en la obtención de nutrientes, acceder a mejores nichos, evitar el efecto de toxinas o de condiciones desfavorables y una mejor dispersión bacteriana.

En la simbiosis rizobio-leguminosa, la movilidad tiene una gran relevancia tanto en la quimiotaxis que es responsable de la atracción de los rizobios a la rizosfera, como durante la colonización de la raíz. De hecho, los rizobios que forman biopelículas sobre la raíz en la rizosfera pueden volverse altamente móviles y desplazarse sobre el sustrato en un proceso conocido como movilidad de tipo *swarming* que es dependiente de flagelo (Verstraeten *et al.*, 2008; Amaya-Gómez *et al.*, 2015). No obstante, se han descrito otros tipos de movilidad de superficie donde intervienen otros componentes independientes del flagelo: *twitching*, que es el movimiento superficial de bacterias en las que intervienen los pili bacterianos de tipo IV, *gliding* que se da por la formación de complejos de adhesión focal a la superficie, y *sliding* que es un movimiento de superficie por translocación pasiva que es dependiente del crecimiento bacteriano y

la producción de surfactante, entre otros (**Figura 8**) (Kearns, 2010). Por otra parte, la movilidad de tipo *swimming* es un tipo de movilidad bacteriana que también es dependiente de flagelo, pero, a diferencia de la de tipo *swarming*, se lleva a cabo en ambientes líquidos.



**Figura 8 – Algunos de los tipos de movilidad bacteriana más estudiados. Figura adaptada de Kearns, 2010.**

### *Producción de ácido indolacético (AIA)*

Algunas bacterias, incluyendo los rizobios, tienen la capacidad de producir la fitohormona ácido indolacético (AIA) que promueve en la planta el desarrollo de raíces laterales y adventicias, entre otras funciones. Aunque originalmente la producción de fitohormonas se relacionaba con eventos de patogenicidad (Jameson, 2000), ciertos rizobios pueden producir AIA como por ejemplo en *S. meliloti* y *R. leguminosarum*, donde la producción de esta fitohormona se incrementa en presencia de determinados flavonoides (Prinsen *et al.* 1991). En *S. fredii* NGR234 se ha identificado un operón relacionado con la síntesis de AIA (genes *y4wEFG*) que está bajo regulación de una NB (NB15). Además, estos genes son transcripcionalmente activados por NodD1 y NodD2 en presencia del flavonoide inductor daidzeína, lo que indica que la producción AIA está vinculada a la síntesis de FN en el contexto del establecimiento de la simbiosis con leguminosas (Theunis *et al.*, 2004).

## *Sistemas de secreción bacterianos*

Las bacterias utilizan unas estructuras macromoleculares conocidas como sistemas de secreción para exportar proteínas y ADN a través de la membrana plasmática y la pared celular. Estos complejos permiten a las bacterias interactuar con el entorno, lo que es relevante en la supervivencia bacteriana. Existen diferentes tipos de sistemas de secreción, pero hasta la fecha, solo los primeros siete se han investigado en profundidad (Tseng *et al.*, 2009; Deakin y Broughton, 2009).

En los rizobios, la secuenciación de diversas estirpes ha demostrado que estas bacterias frecuentemente contienen múltiples sistemas de secreción. Sin embargo, la presencia de estos sistemas en el genoma no significa que tengan un papel en la simbiosis. En general, los rizobios contienen los sistemas de secreción de tipo 3 (SST3), SST4, SST5 y SST6, que presentan una alta homología con los que presentan los patógenos bacterianos (Nelson y Sadowski, 2015; Ormeño-Orrillo *et al.*, 2016). Se ha demostrado que los SST3, SST4 y SST6 están involucrados en la simbiosis con leguminosas, ya que éstos translocan unas proteínas conocidas como efectores que suprimen y/o subvierten la respuesta defensiva de la planta, promoviendo en algunos casos la formación de los nódulos (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2015).





## El macrosimbionte: las leguminosas

En la presente Tesis Doctoral se ha trabajado con las leguminosas *P. vulgaris*, *L. leucocephala*, *L. japonicus* y *L. burtii*.

### *Phaseolus vulgaris*

De entre todas las leguminosas, la judía (*P. vulgaris*) es una de las más extensamente cultivadas a lo largo del planeta, participando en la nutrición de cerca de 500 millones de personas. Esta planta desarrolla nódulos de tipo determinado y es considerada una planta promiscua por su capacidad de establecer simbiosis efectiva con un grupo genéticamente heterogéneo de rizobios originarios de diferentes partes del mundo (Laeremans y Vanderleyden, 1998; Martínez-Romero, 2003).

### *Leucaena leucocephala*

La leucena (*L. leucocephala*) es una leguminosa de crecimiento rápido y muy utilizada como fuente de proteínas para el ganado, tanto en verde como en seco. Es un árbol que puede alcanzar hasta 18 m de altura, aunque a veces adquiere porte arbustivo, y del que existen más de 100 cultivares en el mundo. Es nativa de las tierras semiáridas de América Central y México. Desarrolla nódulos de tipo indeterminado y sus simbiontes más habituales pertenecen a los géneros *Rhizobium* y/o *Bradyrhizobium* (Wang *et al.*, 1999).

### *Lotus japonicus* y *Lotus burtii*

*Lotus japonicus* no es una planta utilizada en agricultura. No obstante, es una de las leguminosas modelo debido a sus características: su ciclo de vida es corto (2-3 meses), puede autofertilizarse y posee una gran simplicidad en la arquitectura de su genoma diploide ( $n=6$ ), que ha sido secuenciado y es de relativamente pequeño tamaño (472 Mb) en comparación con otras leguminosas (Sato *et al.*, 2008). En cuanto

a *L. burttii*, se trata de una planta muy similar a *L. japonicus*. Se ha comenzado a trabajar en investigación con esta planta en los últimos años ya que, debido a su cercanía filogenética, se puede cruzar con *L. japonicus*. Además, esta planta florece y produce semillas en menos tiempo que *L. japonicus*, lo que la ha colocado en otra planta relevante en investigación a pesar de que su genoma no ha sido secuenciado (Kawaguchi *et al.*, 2005).

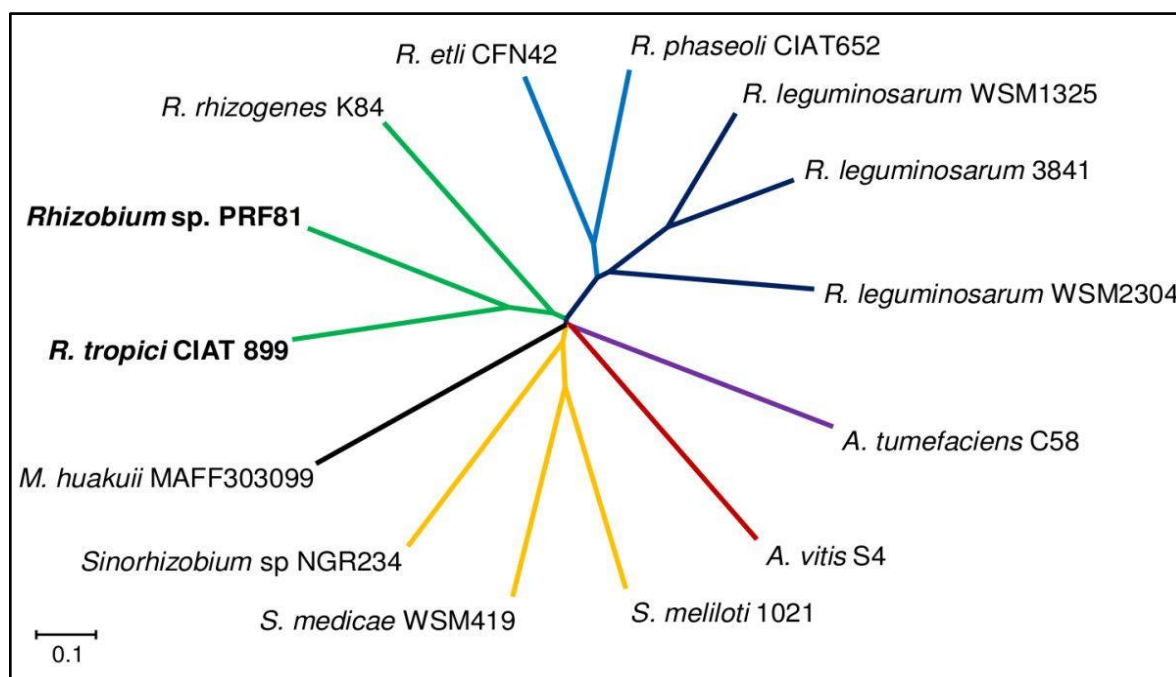
## El microsimbionte: *Rhizobium tropici* CIAT 899

### Antecedentes

En la presente Tesis Doctoral se ha trabajado con la estirpe bacteriana CIAT 899 de *R. tropici*. Esta estirpe se aisló por primera vez en Colombia de nódulos de *P. vulgaris* (Martínez-Romero *et al.*, 1991). Se trata de un rizobio promiscuo por su capacidad de establecer simbiosis con un amplio rango de leguminosas (Hungria *et al.*, 2000). Este rizobio se utiliza a menudo como inoculante ya que es uno de los simbioses más eficientes en judía. Además, CIAT 899 es capaz de tolerar diferentes tipos de estreses abióticos, entre los que se destacan altas temperaturas, suelos ácidos y salinos, y presencia de metales pesados (Martínez-Romero *et al.*, 1991; Hungria *et al.*, 1993; Graham *et al.*, 1994). De hecho, ensayos de campo han determinado que esta estirpe es un buen inoculante bacteriano para el cultivo de leguminosas, especialmente en aquellos suelos sometidos a algún tipo de estrés abiótico (Hungria *et al.*, 2003). Recientemente se ha secuenciado su genoma por lo que esto, sumado a todas estas características mencionadas anteriormente, lo han convertido en un organismo modelo de estudio (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012).

### Filogenia de *R. tropici* CIAT 899

En la última década, los árboles filogenéticos contruidos a partir del ARNr 16S junto a otros genes conservados, sitúan a la especie *R. tropici* en el mismo clado que otras especies como *R. leucaenae*, *R. multihospitium*, *R. lusitanum*, *R. miluonense* y *R. rhizogenes* (Ribeiro *et al.*, 2012). De manera general, en la siguiente **Figura 9** se muestran las relaciones filogenéticas entre los rizobios cuyos genomas se habían secuenciado hasta el 2012, donde CIAT 899 se sitúa próximo a *Rhizobium* sp. PRF81 (actualmente *R. freirei* PRF81) y sorprendentemente más alejada de otras estirpes que nodulan judía como *R. etli* CFN42 o *R. phaseoli* CIAT652 (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012).



**Figura 9 - Relaciones genómicas entre *R. tropici* CIAT 899 y otros rizobios o relacionados basado en el índice de las distancias de genomas MUMi. Esta figura ha sido tomada de Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012.**

No obstante, el aislamiento y secuenciación de nuevos rizobios en los últimos años han incluido nuevas especies en el grupo formado por CIAT 899 y PRF81. Un claro ejemplo es la secuenciación de las estirpes CFN 299 y CPAO 29.8 de *R. leucaenae*, cuyos plásmidos simbióticos presentan una identidad mayor del 99% con el que porta CIAT 899 (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2016). Este hecho sugiere que este plásmido simbiótico podría estar conservado entre diferentes estirpes de rizobios, lo que ha generado la aparición del “simbiovar” *tropici* (grupo de rizobios que portan el mismo plásmido simbiótico). Este simbiovar está en continuo crecimiento en los últimos años debido al aislamiento y secuenciación de nuevas estirpes.

## El genoma de *R. tropici* CIAT 899

Como se ha indicado anteriormente, el genoma de CIAT 899 se secuenció en 2012 (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012). Este genoma está compuesto de 6.686.337 pb repartidas en un cromosoma (3.837.060 pb) y tres plásmidos: pRtrCIAT899a (216.610 pb), pRtrCIAT899b o plásmido simbiótico (549.467 pb) y un megaplásmido pRtrCIAT899c

(2.083.197 pb). En la siguiente **Tabla 2** se recoge información detallada sobre algunas características de los diferentes replicones de CIAT 899.

**Tabla 2 – Información relevante obtenida en la secuenciación del genoma de *R. tropici* CIAT 899.**

<b>Genoma de <i>R. tropici</i> CIAT 899</b>					
	Cromosoma	pRtrCIAT899a	pRtrCIAT899b	pRtrCIAT899c	Total
<b>Tamaño (Mb)</b>	3,8	0,22	0,55	2,08	6,69
<b>G + C (%)</b>	59,9	58,6	57,6	59,4	59,5
<b>Numero Genes</b>	3734	212	500	1905	
<b>Secuencias codificantes</b>	3672	212	500	1905	6289
<b>ARNt</b>	53	-	-	-	-
<b>ARNr</b>	9	-	-	-	-

La secuenciación del genoma ha permitido identificar la presencia de hasta cinco genes *nodD* en el plásmido simbiótico, característica atípica en el resto de los rizobios y hecho que también ocurre en algunas de las estirpes pertenecientes al simbiovar *tropici*. La presencia de estos cinco genes *nodD* sugiere la existencia de una vía compleja de regulación de los genes relacionados con la nodulación. Otro aspecto para resaltar es la presencia de hasta tres genes *nodA*, característica de nuevo única entre los rizobios descritos. De estos tres genes, los genes *nodA1* y *nodA2* se encuentran en dos operones donde se localizan la mayoría de los genes *nod* de CIAT 899: *nodA1BCSUIJHPQ* y *nodA2hsnTnodFE* (**Figura 10, Tabla 3**). Estos dos operones están precedidos por dos NB. También se han identificado otros genes *nod* repartidos por el plásmido simbiótico: *nodA3*, carente de NB y aguas arriba de *nodD3*; *nodM*, precedido por una NB; *nodD4*, que se encuentra próximo a un operón de dos genes cuya función es desconocida pero que son precedidos por otra NB; y *nodD5*, muy próximo al operón *y4wEF* implicado en la síntesis de la fitohormona ácido indolacético (AIA), y que está precedido por una NB. En cuanto a los genes relacionados con la fijación de nitrógeno, se encuentran agrupados en los siguientes cuatro operones en el plásmido simbiótico de CIAT 899: *nifHDKENX*, *nifTZfdxNfixNnifBAfixXCBA* *nifWSUQ*, *nifEN*, *fixLJK* y *fixNOPQ*.

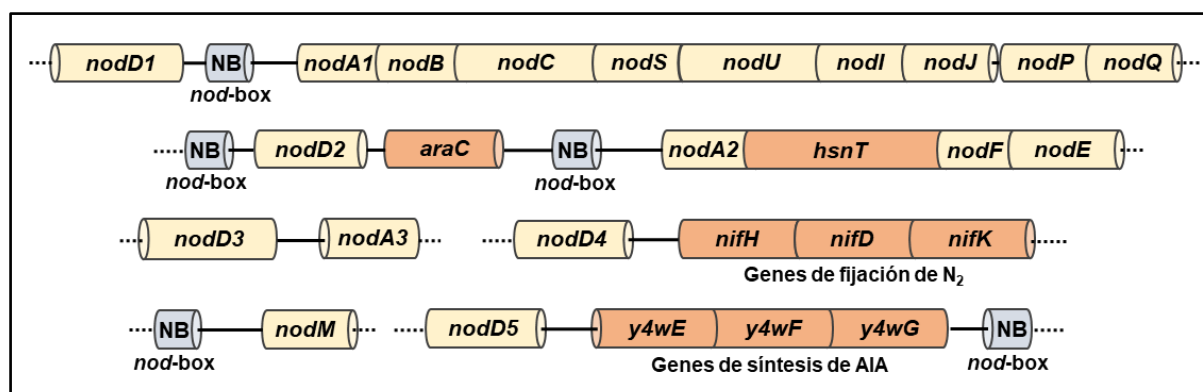


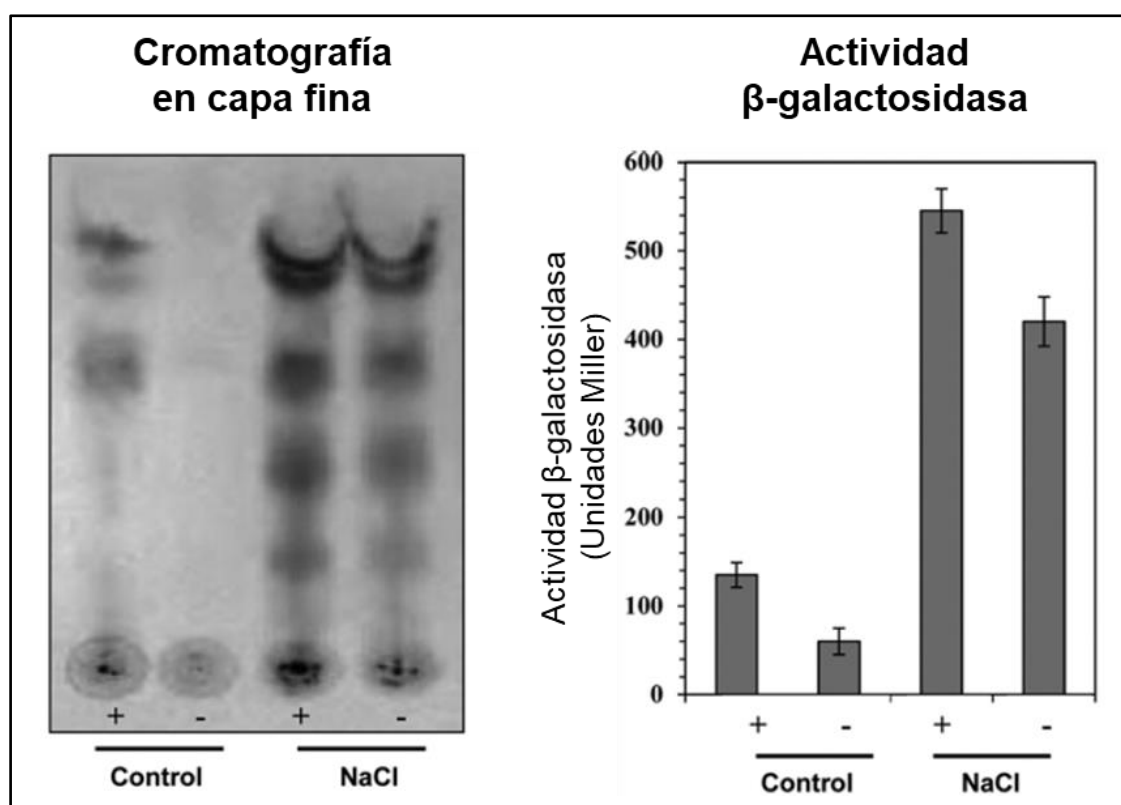
Figura 10 – Genes *nod* descritos hasta la fecha y presentes en el plásmido simbiótico de *R. tropici* CIAT 899.

Tabla 3 – Genes *nod* de *R. tropici* CIAT 899 cuya función ha sido descrita.

Gen	Función
<i>nodA1</i>	Aciltransferasa
<i>nodB</i>	Quitina desacetilasa
<i>nodC</i>	N-acetilglucosamina transferasa
<i>nodS</i>	N-metiltransferasa
<i>nodU</i>	O-carbamoil transferasa
<i>nodI, nodJ</i>	Exportación del FN
<i>nodH</i>	Sulfotransferasa
<i>nodPQ</i>	Síntesis de sulfato en forma activa
<i>nodA2</i>	Aciltransferasa
<i>nodE, nodF</i>	Síntesis de ácidos grasos poliinsaturados
<i>nodM</i>	Glucosamina sintasa
<i>nodA3</i>	Aciltransferasa
<i>nodD1</i>	Regulador transcripcional de otros genes <i>nod</i>
<i>nodD2</i>	Regulador transcripcional de otros genes <i>nod</i>
<i>nodD3</i>	Regulador transcripcional de otros genes <i>nod</i>
<i>nodD4</i>	Regulador transcripcional de otros genes <i>nod</i>
<i>nodD5</i>	Regulador transcripcional de otros genes <i>nod</i>
<i>nodR</i>	Represor de genes <i>nod</i>

## Producción de FN en presencia de flavonoides y estrés salino

Entre los flavonoides ensayados, se ha observado que los que más inducen los genes *nodABC* de CIAT 899 son: naringenina, apigenina, 7-hidroxiavona y crisina (Van Rhijn *et al.*, 1994). Recientemente, se ha observado que la producción de FN en presencia de apigenina está regulada por el gen *nodD1* (Guasch-Vidal *et al.*, 2013). Pero la mayor peculiaridad de este rizobio es que posee la capacidad de sintetizar FN en presencia de estrés salino (300 mM NaCl) (**Figura 11**) (Estévez *et al.*, 2009; Guasch-Vidal *et al.*, 2013). Además, esta síntesis es independiente de flavonoides y no está regulada por NodD1, lo que convierte a la estirpe CIAT 899 en el primer rizobio descrito hasta la fecha capaz de sintetizar estas moléculas en presencia de un estrés abiótico (Guasch-Vidal *et al.*, 2013).



**Figura 11 - Efecto del estrés salino (NaCl 300 mM) en la biosíntesis de FN determinado por cromatografía en capa fina y análisis de la expresión de los genes *nod* cuantificada por actividad β-galactosidasa (promotor *nodP::lacZ*) en *R. tropici* CIAT 899. Las condiciones fueron medio B<sup>-</sup> (control) y medio B<sup>-</sup> suplementado con 300 mM NaCl (NaCl). Los carriles marcados con + fueron suplementados con apigenina (1 μM). Figuras tomadas de Guasch-Vidal *et al.*, 2013.**

Hasta la fecha no se ha descrito el gen o genes responsable/s de la síntesis de FN en presencia de estrés salino. Por tanto, y a raíz de estos antecedentes, se presentan los siguientes objetivos para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.



# OBJETIVOS

---



## Objetivos

En la presente Tesis Doctoral se han propuesto los siguientes objetivos:

- 1) Realizar análisis transcriptómico de *R. tropici* CIAT 899 en presencia de flavonoides y estrés osmótico.
- 2) Estudiar el papel simbiótico de los cinco reguladores NodD de *R. tropici* CIAT 899.
- 3) Estudiar el papel simbiótico de las tres proteínas NodA de *R. tropici* CIAT 899.
- 4) Caracterizar otros genes implicados en la síntesis FN bajo estrés osmótico.



# MATERIAL Y MÉTODOS

---



## Estirpes y plásmidos utilizados

### Estirpes bacterianas

Las estirpes bacterianas y los plásmidos utilizados en la presente Tesis Doctoral se recogen en las **Tablas 4-7**.

#### *Estirpes de Escherichia coli*

**Tabla 4 – Estirpes de *E. coli* utilizadas en la presente Tesis Doctoral.**

Nombre	Características relevantes	Referencia
DH5α	<i>SupE44, lacU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, (NaI<sup>R</sup>)</i>	Sambrook et al., (1989)

#### *Rhizobium tropici* CIAT 899 y sus derivados

**Tabla 5 – Estirpes de *R. tropici* CIAT 899 utilizadas en la presente Tesis Doctoral.**

Nombre	Características relevantes	Referencia
<i>R. tropici</i> CIAT 899	Estirpe silvestre (Rif <sup>R</sup> )	Martínez-Romero et al., (1991)
RSP82	Estirpe CIAT 899 que porta un casete Km insertado en el gen <i>nodD1</i> (Km <sup>R</sup> )	Guasch-Vidal et al., (2013)
<i>nodD2::Ω</i>	Estirpe CIAT 899 que porta el interposón Ω insertado en el gen <i>nodD2</i> (Spc <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<i>nodD3::Ω</i>	Estirpe CIAT 899 que porta el interposón Ω insertado en el gen <i>nodD3</i> (Spc <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<i>nodD4::Ω</i>	Estirpe CIAT 899 que porta el interposón Ω insertado en el gen <i>nodD4</i> (Spc <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<i>nodD5::Ω</i>	Estirpe CIAT 899 que porta el interposón Ω insertado en el gen <i>nodD5</i> (Spc <sup>R</sup> )	Esta Tesis
$\Delta$ <i>nodD1</i>	Estirpe CIAT 899 con el gen <i>nodD1</i> deletado	Esta Tesis
$\Delta$ <i>nodD1</i> / $\Delta$ <i>nodD2</i>	Estirpe CIAT 899 con los genes <i>nodD1/nodD2</i> deletados	Esta Tesis

Nombre	Características relevantes	Referencia
<b><i>nrcR::Ω</i></b>	<i>Estirpe CIAT 899 que porta el interposón Ω insertado en el gen nrcR (Spc<sup>R</sup>)</i>	<i>Esta Tesis</i>
<b><i>nrcR::Ω</i> (pMUS1333)</b>	<i>Estirpe <i>nrcR::Ω</i> complementada en trans: plásmido de expresión portador del gen <i>nrcR</i> silvestre (Rif<sup>R</sup> Spc<sup>R</sup> Gm<sup>R</sup>)</i>	<i>Esta Tesis</i>
<b><i>nrcR::Ω::pMUS1353</i></b>	<i>Estirpe <i>nrcR::Ω</i> complementada en cis: integración genómica del gen <i>nrcR</i> silvestre (Rif<sup>R</sup> Spc<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>)</i>	<i>Esta Tesis</i>
<b><i>ΔnodA1</i></b>	<i>Estirpe CIAT 899 con el gen <i>nodA1</i> deletado</i>	<i>Esta tesis</i>
<b><i>ΔnodA2</i></b>	<i>Estirpe CIAT 899 con el gen <i>nodA2</i> deletado</i>	<i>Esta tesis</i>
<b><i>ΔnodA3</i></b>	<i>Estirpe CIAT 899 con el gen <i>nodA3</i> deletado</i>	<i>Esta tesis</i>
<b><i>ΔnodA1A2</i></b>	<i>Estirpe CIAT 899 con los genes <i>nodA1/nodA2</i> deletados</i>	<i>Esta tesis</i>
<b><i>ΔnodA1A3</i></b>	<i>Estirpe CIAT 899 con los genes <i>nodA1/nodA3</i> deletados</i>	<i>Esta tesis</i>
<b><i>ΔnodA2A3</i></b>	<i>Estirpe CIAT 899 con los genes <i>nodA2/nodA3</i> deletados</i>	<i>Esta tesis</i>
<b><i>ΔnodA1A2A3</i></b>	<i>Estirpe CIAT 899 con los genes <i>nodA1/nodA2/nodA3</i> deletados</i>	<i>Esta tesis</i>
<b><i>ΔaraC</i></b>	<i>Estirpe CIAT 899 con el gen <i>araC</i> deletado</i>	<i>Esta tesis</i>
<b><i>R. tropici</i> CIAT 899 (pMP240)</b>	<i>Estirpe CIAT 899 con el plásmido pMP240, portador de la fusión <i>pnodA::lacZ</i> (Tc<sup>R</sup>)</i>	<i>Dardanelli et al., (2008)</i>
<b>RSP82 (pMP240)</b>	<i>Mutante RSP82 con el plásmido pMP240 (Km<sup>R</sup> Tc<sup>R</sup>)</i>	<i>Esta Tesis</i>
<b><i>nodD2::Ω</i> (pMP240)</b>	<i>Mutante <i>nodD2::Ω</i> con el plásmido pMP240 (Spc<sup>R</sup> Tc<sup>R</sup>)</i>	<i>Esta Tesis</i>
<b><i>nodD3::Ω</i> (pMP240)</b>	<i>Mutante <i>nodD3::Ω</i> con el plásmido pMP240 (Spc<sup>R</sup> Tc<sup>R</sup>)</i>	<i>Esta Tesis</i>
<b><i>nodD4::Ω</i> (pMP240)</b>	<i>Mutante <i>nodD4::Ω</i> con el plásmido pMP240 (Spc<sup>R</sup> Tc<sup>R</sup>)</i>	<i>Esta Tesis</i>
<b><i>nodD5::Ω</i> (pMP240)</b>	<i>Mutante <i>nodD5::Ω</i> con el plásmido pMP240 (Spc<sup>R</sup> Tc<sup>R</sup>)</i>	<i>Esta Tesis</i>
<b><i>ΔnodD1/ΔnodD2</i> (pMP240)</b>	<i>Mutante <i>ΔnodD1/ΔnodD2</i> con el plásmido pMP240 (Tc<sup>R</sup>)</i>	<i>Esta Tesis</i>
<b><i>ΔaraC</i> (pMP240)</b>	<i>Mutante <i>ΔaraC</i> (RTCIAT899_PB01075) con el plásmido pMP240 (Tc<sup>R</sup>)</i>	<i>Esta Tesis</i>



## Otras estirpes

Tabla 6 – Otras estirpes utilizadas en la presente Tesis Doctoral.

Nombre	Características relevantes	Referencia
<b><i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1 (pZRL4)</b>	<i>A. tumefaciens</i> curada del plásmido pTiC58; con el plásmido pZRL4, portador de la fusión traG::lacZ y del gen traR, (Gm <sup>R</sup> )	Cha et al., (1998)
<b><i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V6</b>	Estirpe silvestre que fija nitrógeno en vida libre	Hungria et al., (2010)

## Plásmidos

Tabla 7 – Plásmidos utilizados en la presente Tesis Doctoral.

Nombre	Características relevantes	Referencia
<b>pRK2013</b>	Plásmido coadyuvante, (Km <sup>R</sup> )	Figurski y Helinski, (1979)
<b>pBBR1-MCS-5</b>	Vector de clonación de amplio rango de hospedador, (Gm <sup>R</sup> )	Kovach et al., (1995)
<b>pMP240</b>	Plásmido que porta la fusión transcripcional entre el promotor del gen nodA de <i>R. leguminosarum</i> bv. viciae con el gen lacZ, (Tc <sup>R</sup> )	De Maagd et al., (1988)
<b>pGEM-T Easy</b>	Vector de clonación de productos de PCR, (Ap <sup>R</sup> )	Promega (EEUU)
<b>pGEM-T Easy::nodD2</b>	Plásmido pGEM-T Easy que porta el gen nodD2 silvestre de CIAT 899 (Ap <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<b>pGEM-T Easy::nodD3</b>	Plásmido pGEM-T Easy que porta el gen nodD3 silvestre de CIAT 899 (Ap <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<b>pGEM-T Easy::nodD4</b>	Plásmido pGEM-T Easy que porta el gen nodD4 silvestre de CIAT 899 (Ap <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<b>pGEM-T Easy::nodD5</b>	Plásmido pGEM-T Easy que porta el gen nodD5 silvestre de CIAT 899 (Ap <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<b>pGEM-T Easy::nrcR</b>	Plásmido pGEM-T Easy que porta el gen nrcR silvestre de CIAT 899, (Ap <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<b>pGEM-T Easy::nodD3::Ω</b>	Plásmido pGEM-T Easy::nodD3 interrumpido con el interposón Ω en el punto SmaI del gen nodD3, (Spc <sup>R</sup> Ap <sup>R</sup> )	Esta Tesis

Nombre	Características relevantes	Referencia
<b>pGEM-T Easy::nrcR::Ω</b>	Plásmido pGEM-T Easy::nrcR interrumpido con el interposón Ω en el punto HindIII del gen nrcR, (Spc <sup>R</sup> Ap <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<b>pHP45Ω</b>	Plásmido que contiene el interposón Ω, (Spc <sup>R</sup> /Str <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> )	Prentki y Krisch, (1984)
<b>pK18mob</b>	Vector de clonación suicida en los rizobios, (Km <sup>R</sup> )	Schäfer et al., (1994)
<b>pK18mob::nodD2</b>	Plásmido pK18mob que porta el gen nodD2 silvestre que proviene del plásmido pGEM-T Easy::nodD2, (Km <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<b>pK18mob::nodD4</b>	Plásmido pK18mob que porta el gen nodD4 silvestre que proviene del plásmido pGEM-T Easy::nodD4, (Km <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<b>pK18mob::nodD5</b>	Plásmido pK18mob que porta el gen nodD5 silvestre que proviene del plásmido pGEM-T Easy::nodD5, (Km <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<b>pK18mob::nodD2::Ω</b>	Plásmido pK18mob::nodD2 interrumpido con el interposón Ω en el punto PstI del gen nodD2, (Spc <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<b>pK18mob::nodD3::Ω</b>	Plásmido pK18mob que porta el gen nodD3::Ω que proviene del plásmido pGEM-T Easy::nodD3::Ω, (Spc <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<b>pK18mob::nodD4::Ω</b>	Plásmido pK18mob::nodD4 interrumpido con el interposón Ω en el punto Sall del gen nodD4, (Spc <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<b>pK18mob::nodD5::Ω</b>	Plásmido pK18mob::nodD5 interrumpido con el interposón Ω en el punto XhoI del gen nodD5, (Spc <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<b>pK18mob::nrcR::Ω</b>	Plásmido pK18mob que porta el gen nrcR::Ω que proviene del plásmido -pGEM-T Easy::nrcR::Ω, (Spc <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> )	Esta Tesis
<b>pK18mobsacB</b>	Vector de clonación suicida en los rizobios, (Km <sup>R</sup> Sac <sup>S</sup> )	Schäfer et al., (1994)
<b>pK18mobsacB::ΔnodD1</b>	Plásmido pK18mobsacB que porta el gen nodD1 deleciónado, (Km <sup>R</sup> Sac <sup>S</sup> )	Esta Tesis
<b>pK18mobsacB::ΔnodD2</b>	Plásmido pK18mobsacB que porta el gen nodD2 deleciónado, (Km <sup>R</sup> Sac <sup>S</sup> )	Esta Tesis
<b>pK18mobsacB::ΔaraC</b>	Plásmido pK18mobsacB que porta el gen araC deleciónado, (Km <sup>R</sup> Sac <sup>S</sup> )	Esta Tesis

Nombre	Características relevantes	Referencia
<b>pK18mobsacB::<math>\Delta</math>nodA1</b>	Plásmido pK18mobsacB que porta el gen <i>nodA1</i> delecionado, ( $Km^R$ $Sac^S$ )	<i>Esta Tesis</i>
<b>pK18mobsacB::<math>\Delta</math>nodA2</b>	Plásmido pK18mobsacB que porta el gen <i>nodA2</i> delecionado, ( $Km^R$ $Sac^S$ )	<i>Esta Tesis</i>
<b>pK18mobsacB::<math>\Delta</math>nodA3</b>	Plásmido pK18mobsacB que porta el gen <i>nodA3</i> delecionado, ( $Km^R$ $Sac^S$ )	<i>Esta Tesis</i>
<b>pMUS1333</b>	pBBR1-MCS-5 que porta el gen <i>nrcR</i> silvestre, ( $Gm^R$ )	<i>Esta Tesis</i>
<b>pMUS1353</b>	pK18mob que porta el gen <i>nrcR</i> silvestre, ( $Gm^R$ )	<i>Esta Tesis</i>



## Medios y agentes selectivos

### Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo utilizados en esta Tesis Doctoral se describe en las **Tablas 8-14**.

#### *Medios para Rhizobium*

**Tabla 8 – Componentes del medio TY.**

Medio TY (Behringer, 1974)	
Extracto de levadura	3 g
Tryptona	5 g
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0,65 g
H <sub>2</sub> O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en la autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C).

**Tabla 9 – Componentes del medio YM.**

Medio YM (Vincent, 1970)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500 mg
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	200 mg
NaCl	100 mg
Extracto de levadura	400 mg
Manitol	10 g
H <sub>2</sub> O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en la autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C).

En los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa se utilizó el medio YM3, que es igual que el medio YM, pero que contiene 3 g de manitol por L de medio en lugar de 10 g L<sup>-1</sup>.

Tabla 10 – Componentes del medio B<sup>-</sup>.

Medio mínimo B <sup>-</sup> (van Brussel <i>et al.</i> , 1977)	
Manitol	500 mg
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	550 mg
KNO <sub>3</sub>	550 mg
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	1300 mg
Fe (III)-NaEDTA <sup>a</sup>	2,5 mL
Solución de oligoelementos <sup>b</sup>	2,5 mL
H <sub>2</sub> O destilada	Completar hasta 1 L

a. La solución Fe (III)-NaEDTA al 1,3% (m/v) se preparó independientemente y se esterilizó por filtración utilizando un filtro de 0,45 µm de diámetro de poro.

Tabla 11 – Solución de oligoelementos del medio B<sup>-</sup>.

b. Solución de oligoelementos (Continuación B <sup>-</sup> )	
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	609 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	97 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1269 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	398 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	35 mg
H <sub>2</sub> O destilada	Completar hasta 1 L

Se ajustó el pH a 5,0 y se esterilizó en autoclave. Una vez frío se le añadieron 10 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M a pH 7,2 estéril por cada litro de medio. Las vitaminas biotina y tiamina se añadieron, disueltas en H<sub>2</sub>O y esterilizadas por filtración utilizando un filtro de 0,22 µm de diámetro de poro, a una concentración final de 0,2 y 5 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Cuando fue necesario los medios se solidificaron con agar al 2%.

### Medios para *E. coli*

Tabla 12 – Componentes del medio LB.

LB (Maniatis <i>et al.</i> , 1982)	
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g

LB (Maniatis <i>et al.</i> , 1982)	
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en la autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C).

Cuando fue necesario el medio se solidificó con agar al 2%.

### *Medios para Azospirillum*

Tabla 13 – Componentes del medio NFb.

NFb (Döbereiner <i>et al.</i> , 1976)	
Ácido málico	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0,02 g
Solución de oligoelementos <sup>a</sup>	2 mL
Azul de bromotimol <sup>b</sup>	2 mL
FeEDTA (Solución 1,64%)	4 mL
Solución de vitaminas <sup>c</sup>	1 mL
KOH	4,5 g
H <sub>2</sub> O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en la autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C). a. La solución de oligoelementos se preparó igual que la del medio mínimo B<sup>-</sup>. b. Solución al 0,5% en 0,2 N KOH.

Tabla 14 – Solución de vitaminas del medio NFb.

c. Solución de vitaminas	
Biotina	10 mg
Piridoxol-HCl	20 mg
H <sub>2</sub> O destilada	Completar hasta 100 mL

La solución de vitaminas se esterilizó por filtración en un filtro de 0,22 µm de diámetro de poro.

Se utilizó el medio NFb semisólido solidificado con agar al 0,4%.

## Medio de conservación de bacterias

Tras cultivar las bacterias en los medios apropiados, la biomasa procedente de 5 mL de cultivo se resuspendió en 2 mL de una solución de peptona al 0,5% (m/v) y de glicerol al 15% (v/v), previamente esterilizada en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C). Esta solución permite la conservación de las cepas durante largos periodos de tiempo a -80 °C.

## Medidas de pH y espectrofotometría

El pH de las soluciones se midió con un pH-metro modelo microPH 2001 (Crison, España). Para realizar las medidas espectrofotométricas se usó el espectrofotómetro Novaspec II (Pharmacia LKB, Suecia) y el lector de placas Synergy HT (BioTek, USA).

## Agentes selectivos

Para la selección e identificación de las diferentes estirpes y plásmidos se utilizaron los siguientes agentes selectivos suministrados por Sigma (EEUU) (**Tabla 15**).

**Tabla 15 – Agentes selectivos.**

Agente selectivo	Solución stock	<i>R. tropici</i>	<i>E. coli</i>
<b>Ampicilina (Ap)</b>	100 mg mL <sup>-1</sup>	-	100 µg mL <sup>-1</sup>
<b>Espectinomicina (Spc)</b>	50 mg mL <sup>-1</sup>	50 µg mL <sup>-1</sup>	100 µg mL <sup>-1</sup>
<b>Gentamicina (Gm)</b>	50 mg mL <sup>-1</sup>	5-50 µg mL <sup>-1</sup>	10 µg mL <sup>-1</sup>
<b>Kanamicina (Km)</b>	30 mg mL <sup>-1</sup>	60 µg mL <sup>-1</sup>	30 µg mL <sup>-1</sup>
<b>Ácido nalidíxico (Nal)</b>	10 mg mL <sup>-1</sup>	10 µg mL <sup>-1</sup>	20 µg mL <sup>-1</sup>
<b>Rifampicina (Rif)</b>	25 mg mL <sup>-1</sup>	50 µg mL <sup>-1</sup>	25 µg mL <sup>-1</sup>
<b>Tetraciclina (Tc)</b>	10 mg mL <sup>-1</sup>	10 µg mL <sup>-1</sup>	10 µg mL <sup>-1</sup>
<b>X-gal*</b>	40 mg mL <sup>-1</sup>	-	40 µg mL <sup>-1</sup>
<b>Sacarosa</b>	-	12,5%	-

\*X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-d-galactopiranosido. - indica que el agente selectivo no se ha utilizado en la bacteria indicada.



La rifampicina se disolvió en metanol y la tetraciclina en etanol al 70%. Los demás antibióticos se disolvieron en H<sub>2</sub>O destilada. El 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-gal), suministrado por Roche (Suiza), se disolvió en N, N-dimetilformamida (40 mg mL<sup>-1</sup>). Los antibióticos y el X-gal se almacenaron a -20 °C. La sacarosa se disolvió en el medio de cultivo TY.

## Flavonoides

En esta Tesis Doctoral se utilizó la apigenina suministrada por Sigma Aldrich (EEUU) disolviéndose a una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup> en etanol absoluto y se añadió a los cultivos hasta alcanzar una concentración final de 3,7  $\mu$ M. La apigenina se almacenó a -20 °C.



## Técnicas de biología molecular

### Conjugación bacteriana triparental

Para la transferencia por conjugación de diversos plásmidos desde *E. coli* a *R. tropici* CIAT 899, se mezclaron en un tubo eppendorf 800 µL de cultivo de la estirpe de *Rhizobium* (estirpe receptora), 200 µL de un cultivo en fase logarítmica de la estirpe de *E. coli* DH5α donadora del plásmido en cuestión y 100 µL de un cultivo en fase logarítmica de la estirpe de *E. coli*, portadora del plásmido pRK2013, que actuó como coadyuvante en la transferencia de los plásmidos ya que contienen el sitio *mob* de movilización de plásmidos.

A continuación, la mezcla se centrifugó durante 3 minutos a 5000 g. El sobrenadante se retiró con cuidado y las células se resuspendieron en 800 µL de agua destilada estéril para retirar los restos de antibióticos, volviéndose a centrifugar a 5000 g durante 3 minutos. Seguidamente, se retiró el sobrenadante dejando alrededor de 75 µL para resuspender el sedimento celular, que se colocó en forma de parche en una placa con medio TY sin antibióticos. La placa se incubó a 28 °C durante no más de 24 horas. La masa celular así crecida se recogió y se resuspendió en 1 mL de TY. Posteriormente, se realizaron las diluciones apropiadas para sembrar placas de TY con los antibióticos adecuados y así seleccionar las estirpes transconjugantes. Las colonias de interés se aislaron por sucesivas siembras en el mismo medio selectivo.

### Transformación en *E. coli*

En primer lugar, se prepararon las células competentes de *E. coli*. Para ello, se preinoculó una colonia de *E. coli* DH5α en 5 mL de medio LB suplementado con ácido nalidíxico (20 µg mL<sup>-1</sup>), y se creció a 37 °C en agitación durante toda la noche. Posteriormente, se añadieron 2,5 mL del cultivo crecido a 200 mL de medio LB, con los mismos antibióticos, y se incubó a 37 °C en agitación hasta que la D.O.<sub>600nm</sub> fue de 0,4-0,5. El cultivo se enfrió en hielo durante 15 minutos y transcurrido este tiempo

se centrifugó a 3500 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular obtenido se resuspendió en 30 mL de solución TBF-I a 4 °C (**Tabla 16**). La mezcla se incubó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 3500 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 4 mL de solución TBF-II a 4 °C (**Tabla 16**). Se repartieron alícuotas de 50 µL en eppendorfs que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

**Tabla 16 – Soluciones empleadas en las transformaciones bacterianas.**

Soluciones empleadas	Composición soluciones
TBF-I	AcK 3 M pH 5,8, MnCl <sub>2</sub> 1 M, CaCl <sub>2</sub> 1 M, RbCl 1 M, Glicerol 15%
TBF-II	MOPS 1 M pH 7, CaCl <sub>2</sub> 1 M, RbCl 1 M, Glicerol 15%

Las células de *E. coli* competentes se descongelaron en hielo durante 5 minutos. Se añadió el ADN plasmídico o la mezcla de ligación, se mezcló suavemente con la pipeta y se incubó en hielo durante, al menos, 20 minutos. Posteriormente, la mezcla se incubó durante 90 segundos en un baño a 42 °C y, una vez transcurrido ese tiempo, se incubó rápidamente en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se añadió 1 mL de medio LB y se incubó a 37 °C en agitación durante una hora. Tras la incubación, se centrifugó durante 3 minutos a 5000 g y se descartó el sobrenadante, dejando alrededor de 100 µL, que se usaron para resuspender el sedimento celular. La mezcla se sembró en placas de medio LB, con los antibióticos adecuados, y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

## Extracción del ADN total

Para la extracción del ADN total de *R. tropici* CIAT 899 y sus mutantes se utilizó el kit G-spin™ Total DNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Corea del Sur). La extracción se realizó siguiendo el protocolo del fabricante a partir de cultivos de 1,5 mL de cultivos bacterianos que se crecieron en TY en un agitador orbital (180 rpm) durante 48 horas a una temperatura de 28 °C.

## Extracción del ADN plasmídico (minipreps)

La extracción de plásmidos de cultivos de *E. coli* se realizó utilizando el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, EEUU). La extracción se realizó siguiendo el protocolo del fabricante a partir de cultivos de 1,5 mL de cultivos bacterianos que se crecieron en LB en un agitador orbital (180 rpm) durante 24 horas a una temperatura de 37 °C.

## Restricción del ADN

Se utilizaron las enzimas de restricción suministradas por New England Biolabs (EEUU). Si la endonucleasa originó extremos 5' monocatenarios, éstos se pueden convertir en bicatenarios mediante la actividad polimerasa del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* en presencia de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs). Cuando fue necesario, con el fragmento Klenow (Roche, Suiza), se pudieron convertir los extremos cohesivos en extremos romos.

## Electroforesis del ADN

Se llevó a cabo en geles de agarosa, preteñidos con bromuro de etidio (5 µl de bromuro de etidio a una concentración de 0,325 mg mL<sup>-1</sup> por cada 50 mL de agarosa), a una concentración variable desde el 0,8% (m/v) hasta el 2% en tampón TAE 0,5X, dependiendo del peso molecular de los fragmentos que se quisieron separar. Las muestras de ADN mezcladas con el tampón de carga se añadieron a los pocillos del gel (**Tabla 17**). Como patrones de referencia se usaron diferentes marcadores de peso molecular, como el ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción *Hind*III o marcadores tipo escalera de 100 pb o de 1 kb (Bioline, Reino Unido). La electroforesis se realizó en cubetas Mupid-One (Advance, Japón) a 100 V utilizando tampón TAE (**Tabla 17**). Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV. Las imágenes se capturaron mediante el aparato de captación de imágenes Gel Doc<sup>TM</sup> XR+ (Bio-

Rad, EEUU) y se analizaron con el programa informático Image Lab™ (Bio-Rad, EEUU).

**Tabla 17 – Soluciones empleadas en la electroforesis del ADN.**

<b>Soluciones empleadas</b>	<b>Composición soluciones</b>
<b>Tampón TAE</b>	Tris-HCl 30 mM, 0,002% (v/v) EDTA 0,5 M pH 8, ácido acético glacial 0,00114% (v/v). Ajustar el pH a 8
<b>Tampón de carga</b>	Azul de bromofenol 0,25% (m/v), xileno cianol FF 0,25% (m/v), glicerol 30% (v/v)

## Aislamiento del ADN de geles de agarosa

Para purificar fragmentos de ADN de un gel de agarosa se cortó la porción de gel que contenía la banda de interés y se purificó mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## Desfosforilación del ADN

La desfosforilación del ADN se realiza para reducir la autoligación de vectores linealizados tras la restricción con una enzima. Tras la digestión enzimática, se añadió a la mezcla de reacción la enzima fosfatasa alcalina (Roche, Suiza) y se incubó la reacción durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, se inactivó la enzima añadiendo ácido etilén-glicol tetraacético (EGTA) 0,2 M pH 9,0 a la mezcla de reacción en una proporción 1:10 (v/v). También se puede inactivar la enzima incubando la mezcla durante 15 minutos a 65 °C. Por último, el ADN se purificó mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## Ligación del ADN

Para clonar un fragmento de ADN en un vector, las moléculas de ADN ya digeridas con la(s) enzima(s) de restricción adecuada(s) se purificaron mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EEUU). Para ello, se mezclaron en las proporciones adecuadas (habitualmente en proporción 1:3 vector:inserto), se les añadió 1/10 del volumen final del tampón de ligación y 1  $\mu\text{L}$  ( $1 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ ) de la ligasa del fago T4 (New England Biolabs, EEUU). La mezcla se incubó durante un mínimo de 4 horas a temperatura ambiente. Los productos de la reacción se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* mediante el método descrito anteriormente.

## Amplificación del ADN por PCR

Según la fidelidad requerida de la secuencia a amplificar por PCR, se utilizaron las Taq polimerasas Q5 (alta fidelidad, New England Biolabs, EEUU) o GoTaq® Green Master Mix (PCR convencional, Promega, EEUU). En ambos casos, la reacción de PCR se realizó siguiendo el protocolo establecido por los fabricantes. Cuando se utilizó la enzima Q5, que no incluye los dNTPs en el vial, se añadieron éstos a partir de un stock de 10 mM de dNTPs mix de Bioline (Reino Unido).

Para las reacciones de PCR se siguió el protocolo descrito por Saiki (1990). Los programas usados en cada caso siguen el siguiente esquema común:

- 1 - Desnaturalización del ADN a 95 °C durante 5 minutos.
- 2 - Desnaturalización del ADN a 95 °C durante 30 segundos.
- 3 - Unión de los cebadores al ADN de cadena simple a la temperatura recomendada por el fabricante (Tib Molbiol, Alemania) durante 30 segundos.
- 4 - Polimerización del ADN a 72 °C variando el tiempo de polimerización en función del tamaño del ADN a amplificar (1 minuto por kb).
- 5 - Repetición del ciclo de polimerización (desde el paso 2), 34 veces más.
- 6 - Polimerización del ADN a 72 °C durante 5 minutos.

El volumen de la mezcla de reacción varió dependiendo del experimento. Como norma general, 20  $\mu\text{L}$  de mezcla reacción contenían los cebadores usados a una concentración de 0,2  $\mu\text{M}$ , dNTPs a 0,2 mM, tampón de PCR 1X y 0,1 U de Taq polimerasa.

Para diseñar los cebadores se tuvo en cuenta que:

- La longitud fuera de alrededor de 20 nucleótidos.
- El porcentaje de G + C estuviera comprendido entre 55-65%.
- La temperatura de fusión ( $T_m$ ) estuviera comprendida entre 55-65 °C.
- Los cebadores no aparearan entre sí.

### Hibridación ADN:ADN

Se empleó un sistema no radiactivo que se basa en el marcaje de ADN con digoxigenina-UTP y la detección de los híbridos ADN:ADN-digoxigenina mediante enzoinmunoensayo. Para esta detección se utilizó un anticuerpo conjugado (antidigoxigenina conjugado con la enzima fosfatasa alcalina). Las bandas de hibridación se visualizaron mediante una reacción colorimétrica en el mismo filtro de hibridación.

En primer lugar, tras extraer el ADN total y tras la digestión con la(s) enzima(s) de restricción adecuada(s) se realizó la electroforesis en gel de agarosa donde se incluyó el marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind*III marcado con digoxigenina (Roche, Suiza). A continuación, el ADN del gel de agarosa se transfirió a filtros de nylon Hybond-N (Amersham Biosciences, Reino Unido). Para ello, el gel, inmediatamente después de la electroforesis, se sumergió en HCl 0,25 M durante 20 minutos con agitación suave. Posteriormente, se lavó con agua destilada y se mantuvo en una solución de desnaturalización durante 30 minutos en agitación. La transferencia del ADN a los filtros se realizó por presión durante aproximadamente 15 horas en presencia del tampón de transferencia alcalino. Transcurrido ese tiempo, los filtros se lavaron en SSC 2X durante 5 minutos. Finalmente, el ADN se fijó al filtro por exposición a la luz



ultravioleta durante 2 minutos. La composición de las soluciones utilizadas se muestran en la **Tabla 18**.

**Tabla 18 – Soluciones empleadas en la hibridación ADN:ADN (I).**

<b>Soluciones empleadas</b>	<b>Composición soluciones</b>
<b>SSC 20X</b>	NaCl 2,1 M, citrato de sodio 0,3 M. Ajustar el pH a 7
<b>Solución de desnaturalización</b>	NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M
<b>Tampón de transferencia alcalino</b>	NaCl 1,5 M, NaOH 0,25 M

El marcaje de la sonda se realizó mediante una PCR en la que se añadió a la mezcla normal de PCR 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10X que contenía UTP marcado con digoxigenina. A continuación, se procedió a la hibridación. Para ello, al filtro de nylon se le añadió la solución de pre-hibridación que contiene esperma de salmón ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) previamente desnaturalizado por calor ( $95^\circ\text{C}$  durante 10 minutos y 5 minutos en hielo) (**Tabla 19**). El filtro se pre-hibridó con esta solución incubándolo de 2 a 6 horas a  $42^\circ\text{C}$ . Transcurrido este tiempo, se retiró la solución de pre-hibridación y se añadió la sonda, previamente desnaturalizada por calor ( $95^\circ\text{C}$  durante 10 minutos y 5 minutos en hielo) y diluida en 2,5 mL de solución de pre-hibridación. El filtro se incubó con esta nueva solución durante toda la noche a  $42^\circ\text{C}$ . Transcurrido este tiempo se lavó el filtro dos veces con una solución de SSC 2X, SDS 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavó otras dos veces con SSC 1X, SDS 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente y, por último, se realizaron dos lavados más con SSC 0,1X, SDS 0,1% durante 15 minutos a  $68^\circ\text{C}$ .

**Tabla 19 – Soluciones empleadas en la hibridación ADN:ADN (II).**

<b>Soluciones empleadas</b>	<b>Composición soluciones</b>
<b>SSC 20X</b>	NaCl 2,1 M, citrato de sodio 0,3 M. Ajustar el pH a 7
<b>SDS 20%</b>	SDS $200 \text{ g L}^{-1}$
<b>Solución de prehibridación</b>	100 mL SSC 20X (v/v), 0,4 mL SDS 20% (m/v), 100 mL $\text{H}_2\text{O}$ destilada, 20 g de reactivo de bloqueo (Roche), 0,4 g N-laurilsarcosina

Finalmente, se llevó a cabo la detección inmunológica. Después de realizar los lavados, el filtro se incubó durante 5 minutos en 100 mL de tampón 1 a temperatura ambiente y en agitación, para eliminar los restos de SDS. Posteriormente, los filtros se introdujeron en bolsas de hibridación junto con 10 mL de tampón 2 y se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. A continuación, se retiró el tampón 2 y se cambió por una nueva solución de tampón 2 que contenía el anticuerpo anti-digoxigenina en una proporción de 1:5000 (v/v). El filtro se incubó en esta solución durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Para eliminar el anticuerpo no fijado, el filtro se extrajo de las bolsas y se lavó dos veces durante 15 minutos en 100 mL de tampón 1 a temperatura ambiente con agitación. Finalmente, el filtro se equilibró en 50 mL de tampón 3 durante 5 minutos. Para visualizar el resultado se usó un método colorimétrico que consiste en introducir los filtros en bolsas de hibridación herméticamente selladas junto con una solución de revelado. Las bolsas se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que el resultado de la hibridación fuera claramente visible. Posteriormente, los filtros se lavaron con agua destilada y se secaron al aire. Las soluciones utilizadas se muestran en la **Tabla 20**.

**Tabla 20 – Soluciones empleadas en la hibridación ADN:ADN (III).**

<b>Soluciones empleadas</b>	<b>Composición soluciones</b>
<b>Tampón 1</b>	Tris-HCl 100 mM pH 8 y NaCl 150 mM
<b>Tampón 2</b>	Reactivo de bloqueo al 2% (m/v) disuelto en tampón 1
<b>Tampón 3</b>	Tris-HCl 80 mM pH 9,5, NaCl 100 mM y MgCl <sub>2</sub> 50 mM
<b>Solución de revelado</b>	66 µL de solución NBT (75 mg mL <sup>-1</sup> de nitroazul tetrazolio en dimetilformamida al 70%), 66 µL de solución BCIP (50 mg mL <sup>-1</sup> de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato en dimetilformamida al 100%) en 10 mL de tampón 3

## Secuenciación del ADN y búsqueda de promotores

La secuenciación del ADN se llevó a cabo en los servicios de secuenciación de la empresa STAB VIDA (Portugal). Para el análisis informático básico de las secuencias de ADN se empleó el programa de comparación de secuencias BLASTn disponible en la página web del NCBI.

Para la búsqueda de secuencias consenso de las cajas de nodulación (NB) de los genes que pudieran estar regulados por NodD, se usó la aplicación fuzznuc del paquete de bioinformática EMBOSS. El patrón de búsqueda utilizado fue: AT[CT][CG][AG]N5[TC][GA][GA]ATN7AT[CT]CAAACAATC[GA]ATTTTNCN2AT. Las secuencias de ADN se alinearon usando el programa ClustalW y se modificaron con Boxshade en EMBnet.

## Mutagénesis

### *Mutagénesis dirigida mediante inserción del interposón $\Omega$*

En general, para mutar el gen diana con el interposón  $\Omega$  ( $\text{Spc}^R/\text{Str}^R$ ), se amplificó el gen de interés mediante PCR y se clonó en el plásmido pGEM-T Easy. A continuación, este plásmido se digirió con una o dos enzimas de restricción de interés, cuya diana/s se encuentra/n situada/s en el interior de la secuencia del gen a mutagenizar. El plásmido linealizado se ligó con un fragmento de 2 kb que contiene el interposón  $\Omega$  digerido previamente con la/s mismas enzimas de restricción o con enzimas que generan extremos romos. Este interposón  $\Omega$  fue obtenido a partir del plásmido pHP45 $\Omega$ . Una vez interrumpido el gen diana, el fragmento que lo contiene se escindió de plásmido pGEM-T Easy usando las enzimas adecuadas y se clonó en el plásmido suicida en los rizobios pK18*mob* ( $\text{Km}^R$ ). Cuando fue de interés, antes de interrumpir el gen por medio del interposón  $\Omega$ , este fragmento se clonó en pK18*mob* y ahí se interrumpió el gen con el interposón. Finalmente, el plásmido pK18*mob* con el gen mutado por inserción del interposón, se transfirió a la estirpe parental CIAT 899 mediante conjugación triparental. Posteriormente, se seleccionaron colonias  $\text{Spc}^R/\text{Str}^R$  y  $\text{Km}^S$  que hubiesen integrado en la copia silvestre la copia mutante por doble recombinación homóloga. Los mutantes obtenidos se comprobaron por PCR y/o hibridación ADN-ADN. Los genes *nodD2*, *nodD3*, *nodD4*, *nodD5* y *nrcR*, se mutaron siguiendo esta estrategia. Los cebadores utilizados para clonar y posteriormente mutar estos genes se muestran en la **Tabla 21**.

A continuación se detalla la obtención de cada uno de los mutantes mediante inserción del interposón  $\Omega$ :

Para construir el mutante en el gen *nodD2*, se clonó un fragmento de 1450 pb en el plásmido pGEM-T Easy. Posteriormente, se cortó un fragmento *EcoRI* que contenía el gen *nodD2* y se clonó en el plásmido pK18*mob* ( $Km^R$ ). El nuevo plásmido obtenido se cortó con la enzima *PstI*, que presenta un único punto de corte en la fase abierta de lectura del gen *nodD2*. Este corte se hizo como utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, y en el mismo punto, se clonó un fragmento *SmaI* que contenía el interposón  $\Omega$  ( $Spc^R$ ) procedente del plásmido pHP45 $\Omega$ . El plásmido obtenido se transfirió por conjugación a *R. tropici* CIAT 899 y la homogenización del gen se seleccionó buscando colonias resistentes a espectinomicina y sensibles a kanamicina.

Para obtener el mutante en el gen *nodD3*, se clonó un fragmento de 1500 pb en el plásmido pGEM-T Easy. Este plásmido se cortó con *SmaI*, que presenta un único punto de corte en la fase abierta de lectura del gen *nodD3*. En este punto se insertó el interposón  $\Omega$  ( $Spc^R$ ) procedente del plásmido pHP45 $\Omega$ . Posteriormente, este plásmido se cortó con *EcoRI*, se seleccionó un fragmento de 3,5 kb que portaba el gen *nodD3::\Omega* y se clonó en el plásmido pK18*mob*, que se cortó también con *EcoRI*. El plásmido obtenido se transfirió por conjugación a *R. tropici* CIAT 899 y la homogenización del gen se seleccionó buscando colonias resistentes a espectinomicina y sensibles a kanamicina.

En el caso del mutante en el gen *nodD4*, se clonó un fragmento de 1497 pb en el plásmido pGEM-T Easy. Posteriormente, se cortó un fragmento *EcoRI* que contenía el gen *nodD4* y se clonó en el plásmido pK18*mob* ( $Km^R$ ). El nuevo plásmido obtenido se cortó con la enzima *SalI*, que presenta un único punto de corte en la fase abierta de lectura del gen *nodD4*. Este corte se hizo como utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, y en el mismo punto se clonó un fragmento *SmaI* que contenía el interposón  $\Omega$  ( $Spc^R$ ) procedente del plásmido pHP45 $\Omega$ . El plásmido obtenido se

transfirió por conjugación a *R. tropici* CIAT 899 y la homogenotización del gen se seleccionó buscando colonias resistentes a espectinomicina y sensibles a kanamicina.

Para obtener el mutante en el gen *nodD5*, se clonó un fragmento de 1478 pb en el plásmido pGEM-T Easy. Posteriormente, se cortó un fragmento *EcoRI* que contenía el gen *nodD5* y se clonó en el plásmido pK18*mob* (Km<sup>R</sup>). El nuevo plásmido obtenido se cortó con la enzima *XhoI*, que presenta un único punto de corte en la fase abierta de lectura del gen *nodD5*. Este corte se hizo como utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, y en el mismo punto se clonó un fragmento *SmaI* que contenía el interposón  $\Omega$  (Spc<sup>R</sup>) procedente del plásmido pHP45 $\Omega$ . El plásmido obtenido se transfirió por conjugación a *R. tropici* CIAT 899 y la homogenotización del gen se seleccionó buscando colonias resistentes a espectinomicina y sensibles a kanamicina.

Finalmente, para obtener el mutante en el gen *nrcR*, se clonó un fragmento de 962 pb en el plásmido pGEM-T Easy. Posteriormente, el plásmido se cortó con *HindIII* que presenta un único punto de corte en la fase abierta de lectura del gen *nrcR*, y en este punto se clonó el interposón  $\Omega$  (Spc<sup>R</sup>) cortado con *HindIII*. A continuación, este plásmido se cortó con *EcoRI*, se seleccionó un fragmento de 2,9 kb que portaba el gen *nrcR::\Omega* y se clonó en el plásmido pK18*mob* que se cortó también con *EcoRI*. El plásmido obtenido se transfirió por conjugación a *R. tropici* CIAT 899 y la homogenotización del gen se seleccionó buscando colonias resistentes a espectinomicina y sensibles a kanamicina.

En todos los casos la homogenotización de la mutación en CIAT 899 se comprobó por PCR y/o hibridación.

**Tabla 21 - Cebadores utilizados en esta Tesis para mutagenizar genes por inserción del interposón  $\Omega$ .**

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Tm (° C)
<i>nodD2</i>	nodD2 F	GAATTGTGGAAAGTCCAATA	47,8
<i>nodD2</i>	nodD2 R	CGCCTCCTGCAGAATTATCT	54,6

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Tm (° C)
<i>nodD3</i>	nodD3 F	ACAATAGTGATCCGGCAAGC	55,4
<i>nodD3</i>	nodD3 R	ATCCGGTGTCATATGAGGTTC	54,7
<i>nodD4</i>	nodD4 F	TGGATGCGGGAGACATTA	62,9
<i>nodD4</i>	nodD4 R	GCGTAAACTTTCCGACGAGT	55,3
<i>nodD5</i>	nodD5 F	CGCGAAATGCTGTTTGAG	52,4
<i>nodD5</i>	nodD5 R	ACATGTGCGCAGGACAAC	56,3
<i>nrcR</i>	nolR-like-F	TAGCAGAGCGATGTCAGA	52,7
<i>nrcR</i>	nolR-like-R	CGATGCCAATTTCCGGAA	53,3

### *Mutagénesis dirigida por delección no polar utilizando el método de PCR solapante*

Esta técnica de mutación se basa en la técnica descrita en Griffiths y Long 2008 con algunas modificaciones. De manera general, para la obtención de los mutantes se realizaron los siguientes pasos:

- Amplificación de fragmentos de entre 300 a 700 pb de longitud de las regiones flanqueantes al gen que se desea mutar, de tal forma que el tamaño del fragmento a deleccionar sea múltiplo de 3 (en fase con la pauta de lectura). Para ello, se diseñaron los cebadores A y B para la PCR una de las regiones flanqueantes del gen, y los cebadores C y D para otra región flanqueante del gen (**Tabla 22**). Los cebadores A y D contienen dianas para determinadas enzima de restricción. Las PCR se realizaron utilizando una Taq polimerasa de alta fidelidad (Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs).
- PCR solapante usando como ADN molde ambos productos amplificados en el paso anterior y la misma Taq polimerasa. A la mezcla de 25 µL de reacción se le añadió una concentración de 2 ng de cada fragmento de ADN molde.
- El amplicón obtenido en este último paso, que contiene las regiones que flanquean el gen que se pretende deleccionar y en ellas dianas para determinadas enzimas de restricción, se cortó con las enzimas correspondientes y se clonó en el plásmido pK18*mobsacB*, que había sido digerido con las mismas enzimas. El plásmido obtenido se introdujo por transformación en *E. coli* DH5α, y desde esta bacteria se transfirió por conjugación triparental a *R. tropici* CIAT 899 para obtener una estirpe donde el

plásmido pK18*mobsacB*, que contiene el gen delecionado, recombine en el genoma de CIAT 899, dando lugar a una estirpe que contiene tanto la copia silvestre como la copia delecionada del gen de interés.

- Selección de la pérdida del plásmido junto a la copia silvestre del gen por auto-recombinación. Para ello, se inoculó la estirpe recombinante simple en medio TY sin antibióticos durante 4-5 días a 28 °C en agitación 180 rpm, lo que favorece los procesos de auto-recombinación. A continuación, se identificaron aquellos candidatos que habían perdido el plásmido pK18*mobsacB* y, para ello, se seleccionaron las estirpes que crecen en sacarosa 12,5% (es viable si la estirpe no tiene el gen *sacB*) y no en presencia de kanamicina. De los candidatos obtenidos, se comprobó si tenían el gen delecionado por PCR y/o hibridación.

Los genes *nodA1*, *nodA2*, *nodA3*, *araC*, *nodD1* y *nodD2*, se mutaron utilizando esta estrategia. En la **Tabla 22** se muestran los cebadores utilizados para delecionar cada uno de estos genes. Mediante la mutación por la técnica de la PCR solapante, se obtuvieron mutantes no polares (en fase con la pauta de lectura del gen), es decir mutantes que no impiden la transcripción de los genes situados agua abajo del gen mutando. De esta forma, si el gen mutado forma parte un operón, se siguen transcribiendo el resto de los genes, cosa que no ocurre cuando se utiliza el interposón  $\Omega$ , que origina mutaciones polares.

**Tabla 22 - Cebadores utilizados para mutagenizar genes por delección mediante PCR solapante.**

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	T <sub>m</sub> (° C)
<i>nodD1</i>	nodD1.A	ATAAAGCTTCGATGAATGGGCCGTCCA	62,1
<i>nodD1</i>	nodD1.B	TCAATCTCAGCCAGCATTGAGTGGATGC	62,5
<i>nodD1</i>	nodD1.C	GCATCCACTCAATGCTGGCTGAGATTGA	62,5
<i>nodD1</i>	nodD1.D	AAAGGATCCGCCGATGTACTCGTCTGCTA	63,8
<i>nodD2</i>	nodD2.A	ATAAAGCTTGTAGGCCATAATGTCCAGA	57,9
<i>nodD2</i>	nodD2.B	ACACATCGAAGGACGATCAAGACCCTTG	61,8
<i>nodD2</i>	nodD2.C	CAAGGGTCTTGATCGTCCTTCGATGTGT	61,8
<i>nodD2</i>	nodD2.D	AAAGGATCCGCGGCTTTATACTCACCA	61,7
<i>nodA1</i>	nodA1 - A	ATAAAGCTTGACAAGTTCGCGACCATT	59,1

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Tm (° C)
<b>nodA1</b>	nodA1 - B	GATCTTCCAATCGGAAAGAAGTCGGCGA	61,9
<b>nodA1</b>	nodA1 - C	TCGCCGACTTCTTTCCGATTGGAAGATC	61,9
<b>nodA1</b>	nodA1 - D	AAAGGATCCGGAAAGAACGTCTTGGGT	61,8
<b>nodA2</b>	nodA2 - A	ATAAAGCTTGACAATCTGCTTGGCAAC	58,3
<b>nodA2</b>	nodA2 - B	CCAATCGGTAGAACATGATCGGCGAGTT	62,0
<b>nodA2</b>	nodA2 - C	AACTCGCCGATCATGTTCTACCGATTGG	62,0
<b>nodA2</b>	nodA2 - D	AAAGGATCCACCAGCTTGGTGATCAGA	61,6
<b>nodA3</b>	nodA3 - A	ATAGAATTCTCGCAGGTTTTGCAATTG	56,5
<b>nodA3</b>	nodA3 - B	TGTCCAATCGGCATGACATGATCGGAGA	63,0
<b>nodA3</b>	nodA3 - C	TCTCCGATCATGTCATGCCGATTGGACA	63,0
<b>nodA3</b>	nodA3 - D	AAAAAGCTTATTCGAAGCTGACAGCAG	58,0
<b>araC</b>	AraCA2 A	ATAGGATCCTGAACGTCTTTGAGTGGGTG	61,2
<b>araC</b>	AraCA2 B	TCCCTCGTTGTATGCGCGGCTTTATACT	63,1
<b>araC</b>	AraCA2 C	AGTATAAAGCGCGCATACAACGAGGGA	63,1
<b>araC</b>	AraCA2 D	AAATCTAGAAAGATGGTCATAGAGGAGGC	57,6

Los nucleótidos subrayados se corresponden con las secuencias diana de distintas enzimas de restricción. AAGCTT: *HindIII*, GGATCC: *BamHI*, GAATTC: *EcoRI* y TCTAGA: *XbaI*.

## Estudios de polisacáridos

### *Estimación de la cantidad de EPS: El método de la antrona-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*

El método de la antrona-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Tomlinson *et al.*, 2010), mide el contenido total de azúcar reductor que se encuentra en una muestra. Este método, se utilizó para determinar las cantidades totales de carbohidratos de los EPS presentes en los sobrenadantes de los cultivos bacterianos. Para esto, CIAT 899 y sus estirpes derivadas se cultivaron en 5 mL de medio líquido YM en un agitador orbital (180 rpm) durante 96 horas a una temperatura de 28 °C. Cuando fue necesario, los medios se suplementaron con NaCl (300 mM) o apigenina (3,7 µM). A continuación, y para eliminar las células, se centrifugaron muestras de 1 mL. De los sobrenadantes del cultivo libre de células, se calculó la cantidad de carbohidratos totales presentes. Para ello, se añadió un volumen de ácido sulfúrico puro a la muestra y se cuantificó la D.O.<sub>620nm</sub>. Para determinar la cantidad de azúcares presentes en las diferentes muestras, se compararon los resultados de espectrometría obtenidos con una recta



patrón, que se había realizado previamente, donde se conocía el valor de absorbancia correspondiente a concentraciones crecientes ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de glucosa.

### *Estudio de los EPS de R. tropici CIAT 899 por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)*

Estos estudios se llevaron a cabo en colaboración con por el grupo del Profesor Miguel Ángel Rodríguez Carvajal del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla.

Para el aislamiento del EPS, las bacterias se cultivaron durante cinco días a una temperatura de 28 °C (fase estacionaria tardía) en 45 mL de medio YM. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos y se descartó el sedimento celular. El sobrenadante se concentró hasta aproximadamente el 20% del volumen inicial en un rotavapor. Después, se añadieron tres volúmenes de etanol frío y la solución se mantuvo a 4 °C durante 24 horas. A continuación, la solución se centrifugó y el precipitado resultante se disolvió en agua. La purificación se realizó mediante diálisis contra agua destilada a 4 °C. Finalmente, se liofilizó y se realizó una cromatografía en gas-líquido (GLC Agilent 7809A, EEUU) acoplado con espectrometría de masas (detector de masas 5975 de Agilent, EEUU). La RMN se llevó a cabo tal y como se describe en Acosta-Jurado *et al.* (2016b).

### *Estudio de los LPS*

Tal y como se describe en Buendía-Clavería *et al.* (2013), para analizar los perfiles de LPS de las muestras de interés se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- Las estirpes se sembraron en 3 mL de TY líquido, con los antibióticos adecuados, durante 3 días a 28 °C en un agitador orbital a 180 rpm. Cuando fue necesario, se añadió 300 mM de NaCl y/o 3,7  $\mu\text{M}$  de apigenina.
- Se recogió la biomasa por centrifugación y se resuspendieron aproximadamente 40-60 mg de esta biomasa en 1 mL de NaCl al 0,9% (m/v).

- La mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 8.000 g y se descartó el sobrenadante.
- El pellet obtenido se lavó tres veces con NaCl al 0,9% (m/v).
- Se añadieron 125 µL de tampón 1, se agitó con vórtex y se hirvió durante 6 minutos.
- Se añadieron 875 µL de tampón 2, 3 µL de solución de ARNasa y 10 µL de solución de ADNasa. La mezcla se incubó durante 4 o 5 horas a 37 °C.
- Se añadieron 15 µL de solución de proteinasa K. La mezcla se agitó en vórtex y se incubó durante 12-15 horas a 37 °C.
- Se añadieron otros 15 µL de solución de proteinasa K y la mezcla se incubó durante 24 horas a 37 °C.
- Pasado este tiempo, se transfirieron 350 µL de la mezcla anterior a un nuevo eppendorf.
- Se añadió un volumen de tampón de resuspensión, se agitó suavemente y se hirvió durante 6 minutos.
- La mezcla se centrifugó durante 7 minutos a 12.000 g y 600 µL del sobrenadante se transfirieron a nuevos tubos eppendorfs.
- Las muestras procesadas de este modo se conservan a -20 °C hasta su uso en electroforesis.

La composición de los tampones y soluciones empleadas se muestran en la **Tabla 23**.

**Tabla 23 – Soluciones empleadas en el estudio de LPS (I).**

<b>Soluciones empleadas</b>	<b>Composición soluciones</b>
<b>Tampón 1</b>	Tris-HCl 60 mM pH 6,8, EDTA 1 mM, SDS 2% (m/v) en H <sub>2</sub> O destilada
<b>Tampón 2</b>	Tris-HCl 60 mM pH 6,8; EDTA 1 mM
<b>Tampón de resuspensión</b>	5,9 mL Tampón 1, 4 mL glicerol puro, 0,8 mL β-mercaptoetanol, 0,05% (v/v) de una solución saturada de azul de bromofenol
<b>Solución de ADNasa I</b>	ADNasa I 1mg mL <sup>-1</sup> en Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl <sub>2</sub> 1 mM
<b>Solución de ARNasa A</b>	ARNasa 10 mg mL <sup>-1</sup> en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 15 mM. Hervir 15 minutos
<b>Solución de Proteinasa K</b>	Proteinasa K 1 mg mL <sup>-1</sup> en H <sub>2</sub> O destilada

La electroforesis de las muestras de LPS se realizó en geles de poliacrilamida (40% acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) al 15% en cubetas Mini Protean III (Bio-Rad, EEUU), a 200 V durante 10 minutos y posteriormente a 175 V durante 60 minutos aproximadamente, utilizando el Tampón de electroforesis de LPS (**Tabla 24**).

**Tabla 24 – Soluciones empleadas en el estudio de LPS (II).**

Soluciones empleadas	Composición soluciones
Tampón de electroforesis de LPS	Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% (m/v), pH 8,3

Para la visualización de los LPS se usó la tinción de plata tal y como se describe en Kittelberger y Hilbink (1993). Todos los pasos se realizaron en agitación y a temperatura ambiente:

- El gel se mantuvo durante, al menos, 3 horas en solución de fijación.
- Pasado este tiempo se eliminó la solución de fijación y se añadió la de oxidación, dejándola actuar durante 10 minutos.
- Tras este tiempo, el gel se lavó 5 veces con H<sub>2</sub>O destilada durante 5 minutos cada vez.
- El gel se incubó en oscuridad con la solución de plata durante 30 minutos.
- Tras esto, el gel se lavó brevemente con H<sub>2</sub>O destilada.
- Después del lavado, el gel se reveló en oscuridad añadiendo la solución de revelado y se mantuvo en esta solución hasta que aparecieron las bandas.
- El revelado se detuvo lavando el gel con abundante H<sub>2</sub>O destilada.
- Una vez parada la reacción el gel se pudo mantener en H<sub>2</sub>O destilada o en Na<sub>2</sub>EDTA al 1,46% (m/v).

Las distintas soluciones utilizadas para la visualización de los LPS se muestran en la **Tabla 25**.

Tabla 25 – Soluciones empleadas en el estudio de LPS (III).

Soluciones empleadas	Composición soluciones
Solución de fijación	Etanol 30%(v/v), ácido acético 10% (v/v) en agua destilada
Solución de oxidación	La misma composición que la solución de fijación, añadiendo además 0,7% (m/v) de peryodato sódico ( $\text{NaIO}_4$ )
Solución de tinción	Nitrato de plata 0,1% ( $\text{AgNO}_3$ ) (m/v) en agua destilada
Solución de revelado	Carbonato sódico 3% ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (m/v), 0,035% de formaldehído al 37% (v/v) en agua destilada

## Ensayos de formación de biopelículas

La medida de la capacidad de formación de biopelículas sobre superficies plásticas por parte de *R. tropici* CIAT 899 y sus mutantes se realizó por el método descrito por Margaret *et al.* (2013). Para ello, se crecieron los cultivos en los medios TY o B<sup>-</sup>, para comprobar si el tipo de medio podía también influenciar en la formación de la biopelícula. Cuando fue necesario, se añadió 300 mM NaCl o apigenina 3,7  $\mu\text{M}$ . Una vez crecidas las bacterias, los cultivos se diluyeron hasta una D.O.<sub>600nm</sub> de 0,2 y se inocularon 100  $\mu\text{L}$  de este cultivo en placas de 96 pocillos de poliestireno. Las placas se cerraron con una tapa estéril para prevenir la evaporación y se incubaron boca abajo a 28 °C durante 48 horas y sin agitación. El crecimiento bacteriano se cuantificó a través de la medida de la D.O.<sub>600nm</sub> al final del experimento. El contenido de los pocillos se retiró y se secó a temperatura ambiente para luego lavarlos 3 veces con solución salina estéril (NaCl 0,9%). Posteriormente, los pocillos se secaron a temperatura ambiente. Una vez secos, los pocillos se tiñeron con 100  $\mu\text{L}$  de cristal violeta 0,1% durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. Por último, la cuantificación de la biopelícula formada se llevó a cabo por la adición de 100  $\mu\text{L}$  de etanol al 96% en cada pocillo para solubilizar el cristal violeta y se calculó de la cantidad de colorante que se había unido mediante un lector de placas multipocillos a una D.O.<sub>570nm</sub> (Synergy HT; BioTek; EEUU). Cada experimento se llevó a cabo por triplicado y se analizaron 12 pocillos por tratamiento.

## Ensayos de detección de AHL

Para la detección de las AHL producidas por las tres estirpes bacterianas, se llevaron a cabo ensayos de difusión en placa de Petri usando al biosensor *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) tal y como se describe en Cha *et al.* 1998. El método consistió en colocar cilindros metálicos de 0,8 cm de diámetro por 1 cm de altura previamente esterilizados en placas de Petri sobre las que se dejó solidificar medio YM con agar. Posteriormente, se añadió a cada placa 4 mL de agar de cobertera con 400  $\mu$ L de cultivo crecido hasta fase estacionaria del biosensor *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) y 40  $\mu$ L de X-Gal (20 mg mL<sup>-1</sup>). Después de solidificarse, se retiraron los cilindros metálicos y en cada pocillo se añadieron 200  $\mu$ L de los sobrenadantes bacterianos obtenidos a partir de cultivos crecidos hasta la fase estacionaria durante al menos 6 días. Cuando fue necesario, se añadió 300 mM NaCl y/o apigenina 3,7  $\mu$ M a los medios de cultivos. Las placas se incubaron 48 horas a 28 °C.

## Extracción, separación y detección de AHL mediante cromatografía en capa fina (TLC)

La TLC (del inglés, *Thin Layer Chromatography*, TLC) se empleó para separar las diferentes AHL sintetizadas por las bacterias. Para ello, se obtuvieron sobrenadantes de las bacterias crecidas durante 6 días en 15 mL de medio YM3 y se extrajeron con un volumen de diclorometano. Cuando fue necesario, se añadió 300 mM NaCl o apigenina 3,7  $\mu$ M. Tras esto, se evaporó el diclorometano hasta sequedad a temperatura ambiente y el sedimento resultante se resuspendió en 150  $\mu$ L de acetato de etilo acidificado (0,1% de ácido acético glacial). Para cada bacteria, se cargó un volumen adecuado que osciló entre 10 y 30  $\mu$ L de muestra del concentrado en la TLC (HPTLC plates RP-18 F254S, Merck, Alemania) y se usó metanol:agua (60:40 v/v) como fase móvil. Por último, se dejó secar la cromatoplaque para evaporar todo el solvente.

Tras la separación de las AHL mediante TLC, su detección se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Cha *et al.* (1998). Se usaron, según el número de muestras

cargadas, placas TLC de 10x10 cm o de 20x20 cm. Como biosensor para revelar las placas se utilizó *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4). Según el tamaño de la placa, se mezclaron 20 u 80 mL de YM3 1,2% de agar, 10 o 40 mL de cultivo del biosensor crecido hasta fase estacionaria y 40 o 160  $\mu$ L de X-gal ( $40 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Finalmente, se vertió la mezcla sobre la placa TLC, que previamente fue colocada en placas de Petri cuadradas del tamaño adecuado. Se incubó durante 48 horas a  $28^\circ\text{C}$  hasta la aparición de bandas azules correspondientes a las AHL. Como controles se utilizaron las AHL comerciales C6 y C8 (Sigma-Aldrich S.A, EEUU). Estas AHL se prepararon a una concentración de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  en acetato de etilo acidificado. De esta suspensión, se tomaron 5  $\mu$ L y se resuspendieron en 200  $\mu$ L de agua, que fue lo que se cargó en la TLC.

### Ensayos de movilidad en superficie y movilidad tipo *swimming*

Los ensayos de movilidad en superficie y tipo *swimming* se llevaron a cabo en los medios TY y B<sup>-</sup> (complementado cuando es necesario con NaCl 300 mM o apigenina  $3,7 \mu\text{M}$ ) conteniendo 0,4% o 0,28% de agar (Bacto, Francia), respectivamente. Las estirpes para ensayar se cultivaron en 5 mL de medio TY en un agitador orbital (180 rpm) durante 96 horas a una temperatura de  $28^\circ\text{C}$ . Cuando fue necesario, se añadió 300 mM NaCl y/o apigenina  $3,7 \mu\text{M}$ . De estos cultivos, se inocularon 2  $\mu$ L sobre el agar (movilidad de superficie) o dentro del agar (movilidad *swimming*). Las placas inoculadas se envolvieron con parafilm y se incubaron hasta 96 horas a  $28^\circ\text{C}$  en posición vertical. Se midió el halo de movimiento cada 24 horas. Cada experimento se realizó tres veces con tres repeticiones cada vez.

### Cuantificación de la producción de ácido indolacético (AIA)

Para cuantificar la cantidad de AIA de un cultivo, se cuantificó la producción de grupos indol según el método descrito por Patten y Glick (2002). Para ello, se crecieron las bacterias en medio TY suplementado con triptófano ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) en un agitador orbital (180 rpm) durante 96 horas a una temperatura de  $28^\circ\text{C}$ . Cuando fue necesario, se añadió 300 mM NaCl o apigenina  $3,7 \mu\text{M}$ . El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos

utilizando el reactivo de Salkowski (**Tabla 26**) (Bric *et al.*, 1991). En cada pocillo se pusieron 100  $\mu$ L de reactivo de Salkowski y 100  $\mu$ L del sobrenadante del cultivo en fase estacionaria de cada uno de los aislamientos. La reacción se mantuvo hasta la aparición del color rojizo (unos 30 minutos aproximadamente). Posteriormente, se midió la D.O.<sub>535nm</sub>. En paralelo se realizó una recta de calibrado con concentraciones conocidas de AIA, lo que permitió cuantificar el AIA producido por estas bacterias.

**Tabla 26 – Soluciones empleadas en el estudio de AIA.**

Soluciones empleadas	Composición soluciones
<b>Reactivo Salkowski</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 98% 150 mL, H <sub>2</sub> O destilada 250 mL y FeCl <sub>3</sub> 0,5 M 7,5 mL

## Cuantificación de la expresión de genes bacterianos por PCR cuantitativa

Una de las estrategias seguidas para cuantificar la expresión de genes bacterianos fue realizar experimentos de PCR cuantitativa o qRT-PCR a partir de los ADNc previamente retrotranscritos a partir de ARNm de dichos genes.

Para la extracción del ARN total, los cultivos de las estirpes de *R. tropici* CIAT 899 se sembraron en medio TY (suplementado con NaCl 300 mM o apigenina 3,7  $\mu$ M cuando fue necesario), se incubaron a 28 °C y en agitación (180 rpm) durante 48 horas. La extracción del ARN bacteriano se realizó utilizando los kits High Pure RNA isolation kit (Roche, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido se cuantificó en un Nanodrop de Thermo Scientific NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, EEUU). A continuación, se llevó a cabo la retrotranscripción utilizando el kit PrimeScript RT reagent (Takara, Japón) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se utilizó como molde para llevar a cabo reacciones de qRT-PCR.

Los cebadores utilizados se diseñaron teniendo en cuenta que la longitud del amplicón estuviera comprendida entre 140 y 180 pb (**Tabla 27**). Asimismo, para asegurar una

eficiencia adecuada se eligieron amplicones que no mostrasen estructuras secundarias a la temperatura de apareamiento de los cebadores.

Para realizar los ensayos de qRT-PCR se utilizó el kit FastStart SYBR Green Master (Roche, Suiza) a partir del ADNc obtenido y siguiendo las indicaciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un termociclador LightCycler 480 II (Roche, Suiza). El volumen de la mezcla de reacción fue de 20  $\mu$ L, que contenía los cebadores usados a una concentración de 0,3  $\mu$ M y 5  $\mu$ L de SYBR. Las condiciones programadas para llevar a cabo la reacción de PCR cuantitativa fueron las siguientes:

- Desnaturalización del ADN a 95 °C durante 5 minutos.
- Desnaturalización del ADN a 95 °C durante 5 minutos (40 ciclos).
- Unión de los cebadores al ADN de cadena simple a la temperatura recomendada por el fabricante durante 30 segundos (40 ciclos).
- Polimerización del ADN a 72 °C durante 15 segundos (40 ciclos).
- Repetición a 72 °C durante 5 minutos para que todas las hebras terminen de polimerizar.
- Melting Curve desde 60 °C a 90 °C para ver la afinidad de los cebadores al ADN diana.

Para la obtención del valor expresión diferencial o *Fold Change* se usaron al menos tres muestras biológicas con tres réplicas cada una en cada condición. Con todo ello, se calculó el valor de expresión diferencial usando el método  $\Delta\Delta C_t$  (Pfaffl *et al.*, 2002).

**Tabla 27 - Cebadores utilizados en los experimentos de qRT-PCR.**

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Tm (° C)
<b>nodA1</b>	qpcrnodA1-F	TGATGCTAATGGTGTCTCGCGGC	60,4
<b>nodA1</b>	qpcrnodA1-R	ATGCCCGATCCCCAATCCCT	61,3
<b>nodB</b>	nodBqPCR-F	ACAAGGTCGCCAATCACA	54,5
<b>nodB</b>	nodBqPCR-R	GCGCATATATTGCACCGA	53,1
<b>nodC</b>	qpcrnodc_F	ATCGCGGCAACTGTTGTTCCA	60,1
<b>nodC</b>	qpcrnodc_R	GCGGTCCGAGGTTCTGACCA	61,9
<b>nodS</b>	nodSqPCR-F	GTGCCAGAAGCGATTGAT	53,0



Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Tm (° C)
<i>nodS</i>	nodSqPCR-R	CTGCAACCACGATCAGAT	52,3
<i>nodU</i>	nodUqPCR-F	TTCGAAGAGCTCTACGAG	50,7
<i>nodU</i>	nodUqPCR-R	CTTATCCTCCAATCGGAC	49,3
<i>nodI</i>	nodIqPCR-F	AGCTGCTTGTCATGGATG	52,7
<i>nodI</i>	nodIqPCR-R	GAAGTGGGTGGTCAAGAT	51,7
<i>nodJ</i>	nodJqPCR-F	GCTGGGAAGCAATCCTAT	51,9
<i>nodJ</i>	nodJqPCR-R	CATAGTGGCGACGATCAA	52,0
<i>nodH</i>	nodHqPCR-F	GGGTCAGTGGCTGAAATT	52,6
<i>nodH</i>	nodHqPCR-R	TGCTCGGATCAAACGCAT	54,9
<i>nodA2</i>	qpcrnodA2-F	GGGATTGTACGGGATACGCACCG	61,7
<i>nodA2</i>	qpcrnodA2-R	CGTGCGGAAAAACCGTCACAGG	61,2
<i>hsnT</i>	qPCRhsnT-F	GGCCCGTGCTTGTCTATATG	55,7
<i>hsnT</i>	qPCRhsnT-R	CGGAGACGAGACATGACGTA	56,0
<i>nodF</i>	qPCRnodF-F	GACGAAATAACGACTGAG	47,5
<i>nodF</i>	qPCRnodF-R	TAAACTCGATGCCGATGT	52,1
<i>nodE</i>	qPCRnodE-F	GGCGGTGGATCAGATTAGAC	55,1
<i>nodE</i>	qPCRnodE-R	GCTTCCCAAGACTTCAGCAC	56,3
<i>nodM</i>	nodM-F	TTGCAATAGCGTAGGCAAGC	56,1
<i>nodM</i>	nodM-R	TGATGTGCGCTCCGAATTC	55,3
<i>y4wE</i>	rt-y4we-F	TAGTGTTGGATGAGGCGT	52,9
<i>y4wE</i>	rt-y4we-R	CCTTCCGATAAGTTCAGGA	51,1
<i>y4wF</i>	rt-y4wf-F	CACCAGGCTGCTATGCGGAA	60,3
<i>y4wF</i>	rt-y4wf-R	GGGTCTACCTGTGGCAATCCA	59,2
<i>RTCIAT899_PB01545</i>	HP(NB5)-F	TGAAACTTGAAGGAAGCGCG	56,1
<i>RTCIAT899_PB01545</i>	HP(NB5)-R	TCGACGTGGCAAGGCATTAT	57,1
<i>RTCIAT899_PC04980</i>	Trans pC - F	TGAAGAGAAGTTCGCCATGG	55,0
<i>RTCIAT899_PC04980</i>	Trans pC - R	CGACATCGAGAACTGCTACA	54,3
<i>RTCIAT899_CH06050</i>	Trans Chr2 F	GGCGATCTCTATCTGGTCAA	53,8
<i>RTCIAT899_CH06050</i>	Trans Chr2 R	TTTGCCCGTAACGTCTTCCA	56,9
<i>rpsL</i>	Trans Chr3 F	GCAGGTAAAGCGTAACAAGG	54,0
<i>rpsL</i>	Trans Chr3 R	CGGGGATGTAACCAATGACT	54,6
<i>RTCIAT899_CH14150</i>	Trans Chr4 F	AATCTTCAGCTGTTTCAGGT	53,5
<i>RTCIAT899_CH14150</i>	Trans Chr4 R	ATGCGACCGTCTATGTGCGAA	56,1
<i>nodD2</i>	nodD2qPCR-F	AAAGCGTCTGGCAAGGGAAG	58,1
<i>nodD2</i>	nodD2qPCR-R	TTTTCGTCGAACAGCTTCGC	56,2
<i>fixC</i>	qPCR-FixC-F	TCTCTCTTGGCATCGGTT	53,4
<i>fixC</i>	qPCR-FixC-R	CACCTTCGGGAATGAGAT	51,5
<i>mtlD</i>	qPCR-MtlD-F	CATGGTTCGATCGTATCAC	49,9

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Tm (° C)
<i>mtlD</i>	qPCR-MtlD-R	ACACCGACCTTTTCAAGC	53,1
<i>nodA3</i>	qPCRnodA3F	CACATTGCAGAAGTTTCAA	48,7
<i>nodA3</i>	qPCRnodA3R	GTGGCAGCGTAGATCGTACGCT	61,3
<i>nifH</i>	qPCR-nifH-F	CGTCATCACCTCCATCAACT	51,4
<i>nifH</i>	qPCR-nifH-R	TTCCTGGGCCTTGTTCTC	51,1
<i>mtlE</i>	qPCR-MtlE-F	ATCTGGAGCAAGCTCGGC	57,9
<i>mtlE</i>	qPCR-MtlE-R	ACATCACCATCGAGCTTTTCG	55,2
16S	16S-F	GGGCTGGTAAGGTTCTGCGC	61,3
16S	16S-R	GGTGGCGCAGCTAACGCAT	61,4

## Medida de la actividad $\beta$ -galactosidasa

La determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se emplea para cuantificar la expresión de un gen cuando el promotor dicho gen se fusiona con el gen *lacZ* o cuando se ha insertado un casete con una copia de *lacZ* carente de promotor dentro del gen en cuestión. Para medir esta actividad se siguió el método descrito por Miller (1972). Así, se inocularon tubos con 5 mL de YM3 líquido a partir de cultivos bacterianos en fase exponencial y se incubaron hasta alcanzar una D.O.<sub>660nm</sub> entre 0,15 y 0,3. Posteriormente, se mezclaron en un tubo 200  $\mu$ L de cultivo, 800  $\mu$ L de tampón Z, 20  $\mu$ L de cloroformo y 10  $\mu$ L de SDS 0,1% (m/v) en H<sub>2</sub>O destilada (**Tabla 28**). La mezcla se agitó en vórtex durante 15 segundos y se añadió 200  $\mu$ L de ONPG (orto-nitrofenil- $\beta$ -d-galactopiranosido) preparado a una concentración de 4 mg mL<sup>-1</sup> en tampón Z. La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 500  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M a la reacción. Por último, se cuantificó la D.O.<sub>420nm</sub> de cada tubo. Los experimentos se realizaron por triplicado incluyendo al menos tres réplicas en cada ensayo. Las unidades de actividad  $\beta$ -galactosidasa se calcularon siguiendo la fórmula descrita en Miller (1972).

**Tabla 28 – Soluciones empleadas en la medida de actividad  $\beta$ -galactosidasa.**

Soluciones empleadas	Composición soluciones
<b>Tampón Z</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O 104 mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O 45 mM, KCl 10 mM, MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O 1 mM

Completar hasta 1 L y ajustar el pH a 7,0.

## Estudios de ARNseq

En primer lugar, se llevó a cabo la extracción de ARN total siguiendo la misma metodología empleada anteriormente. Se extrajeron hasta dos muestras independientes por cada condición. Para ello, los cultivos se crecieron en 7 mL de medio TY durante 48 horas a 28 °C en agitación orbital a 180 rpm. Cuando fue necesario, se añadieron los diferentes inductores de los genes *nod* (NaCl 300 mM, apigenina 3,7 µM o manitol 400 mM). A continuación, el ARN ribosómico (ARNr) se eliminó usando el kit MICROB Express Bacterial mRNA Purification (Ambion, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La secuenciación del ADNc se llevó a cabo por la empresa Sistemas Genómicos (España), mediante el uso de la tecnología Next Generation Sequencing (NGS) platform Illumina (EEUU) y el secuenciador Illumina HiSeq 2000 (Illumina, EEUU). Las muestras de ARNm se usaron para generar librerías de ADNc completas a partir de los transcriptomas siguiendo las instrucciones del fabricante para la secuenciación mediante la plataforma NGS. La calidad del ADNc se analizó mediante el kit Bioanalyzer 2100 DNA 1000 (Agilent Technologies, EEUU) y se cuantificó usando un fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen, EEUU).

## Mapeo de los datos de las transcriptómicas

Las lecturas obtenidas por la secuenciación del transcriptoma completo se mapearon frente al genoma de *R. tropici* CIAT 899 (ID del Genoma en NCIB: 11072) usando el algoritmo *Life Technologies mapping* versión 1.3 (EEUU). Las lecturas de baja calidad se eliminaron usando el software *Picard Tools* version 1.83.

## Estimación de los genes diferencialmente expresados

La predicción génica se estimó usando el método *cufflinks* (Trapnell *et al.*, 2010) y los niveles de expresión se calcularon usando el software *htseq* versión 0.5.4p3 (Anders y Huber, 2010). Este método elimina las lecturas multi-mapeadas considerando para la expresión génica solamente las lecturas únicas. El método *edge* versión 3.2.4 se aplicó para el análisis de la expresión diferencial entre las condiciones (Robinson *et al.*, 2010). Este método usa un modelo de *Poisson* para estimar la varianza de los datos de la transcriptómica para la expresión diferencial y depende de diferentes procesos de normalización basados en la rigidez de las muestras, la composición en G+C, y la longitud de los genes. La expresión diferencial de los genes se obtuvo comparando los valores obtenidos en las diferentes estirpes y condiciones respecto a aquellos datos obtenidos para las estirpes CIAT 899 en condiciones control (TY). Los genes diferencialmente expresados para la estirpe CIAT 899, RSP82, *nodD2::Ω* y  $\Delta araC$  en presencia de 300 mM de NaCl o 3,7  $\mu$ M de apigenina se definieron como aquellos genes que presentaron una expresión de cuatro veces más (expresados) o cuatro veces menos (reprimidos) que la expresión detectada en la condición control (*Fold change* de  $\pm 4$ ), y con un valor de *p adjust* inferior a 0,7. En cuanto a los estudios transcriptómicos llevados a cabo en presencia de 400 mM de manitol (estirpes CIAT 899 y *nodD2::Ω*), los genes diferencialmente expresados se definieron como aquellos genes con un *Fold change* de  $\pm 2,5$  y con un valor de *p adjust* inferior a 0,05. Los diferentes niveles de *Fold change* seleccionados en los diferentes estudios de ARNseq, se establecieron en base a los valores de expresión diferencial esperados en ciertos genes determinados en estudios previos y en base a las variaciones de expresión de genes entre muestras biológicas.

## Purificación y análisis por cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas de los FN

Los estudios de cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (del inglés, *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) se llevaron a cabo con la ayuda del grupo del Profesor Antonio Gil Serrano del Departamento de Química

Orgánica de la Universidad de Sevilla. Para el aislamiento y purificación de los FN de las estirpes de interés, se siguió el método descrito en Guasch-Vidal *et al.* (2013):

- Se inocularon tubos con 5 mL de cultivo en medio TY de la bacteria a estudiar. Se dejan creciendo 48 horas en agitación (180 rpm) a 28 °C.
- De los cultivos anteriores, se inocularon 2,5 mL en 100 mL de medio mínimo (B<sup>-</sup>) en las condiciones adecuadas. Estos cultivos se dejaron creciendo durante 72 horas en agitación (180 rpm) a 28 °C. A continuación, los 100 mL de los cultivos crecidos se usaron para inocular matraces que contenían 900 mL del mismo medio, que se dejaron creciendo hasta alcanzar la fase exponencial tardía (4 días) en agitación (180 rpm) a 28 °C.
- Las células se retiraron por centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos, y al sobrenadante se le añadieron 300 mL de *n*-butanol.
- La mezcla se mantuvo en agitación durante 12 horas y posteriormente, se dejó en reposo, al menos, 24 horas más hasta observar una buena separación de las fases acuosa y butanólica.
- Finalmente, se recogió la fase butanólica (superior), que contiene los FN, que se llevó a sequedad en un rotavapor a 45 °C.

La purificación de los FN para su posterior análisis mediante cromatografía líquida de alta presión asociada a espectrometría de masas (del inglés, *High-Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry*, HPLC MS/MS) se realizó utilizando un cartucho de extracción en fase sólida (SPE C18 Resprep, Teknokroma, España). El cartucho se acondicionó con 2 mL de metanol y 2 mL de una disolución de acetonitrilo al 20% en H<sub>2</sub>O (v/v). Seguidamente, la muestra se pasó a través del relleno por aspiración a un flujo aproximado de 5 mL min<sup>-1</sup>. Las sales y otras moléculas muy polares se eliminaron por elución con una disolución acuosa de acetonitrilo al 20% (v/v). Finalmente, se utilizaron 5 mL de metanol para eluir selectivamente los FN de la columna. La fracción metanólica obtenida se concentró, se liofilizó y se resuspendió en 1 mL de acetonitrilo al 20% en H<sub>2</sub>O (v/v).

## Purificación y análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de los FN

Los análisis mediante TLC se realizaron según el método descrito por Spaink (1992). Brevemente, *R. tropici* CIAT 899 se cultivó en 5 mL de medio mínimo B<sup>-</sup>, suplementado cuando fue necesario con NaCl 300 mM, manitol 400 mM o apigenina 3,7 µM. Los cultivos se dejaron creciendo 48 horas en agitación (180 rpm) a 28 °C. Posteriormente, se inocularon 50 µL de estos cultivos crecidos en 1 mL de medio B<sup>-</sup> en las condiciones a estudiar y se añadió a cada tubo 0,2 µCi mL<sup>-1</sup> de *N* acetil-D-[1-<sup>14</sup>C]-glucosamina (Perkin Elmer, EEUU) para el marcaje radioactivo de los FN. Estos cultivos se incubaron en agitación a 28 °C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento.

A continuación, los cultivos se centrifugaron durante 15 minutos a 10.000 g, se descartaron las células y se añadieron 500 µL de *n*-butanol saturado con agua a los sobrenadantes (todo dentro del tubo de 1 mL de cultivo inicial donde habían crecido las bacterias con la marca radioactiva). Esta mezcla se incubó en agitación a 28 °C durante 3-4 horas. Pasado este tiempo, las mezclas se centrifugaron durante 3 minutos a 10.000 g para recuperar la fase butanólica, que se evaporó en una centrífuga de vacío Speed-Vac<sup>TM</sup> Savant (Thermo Fisher Scientific, EEUU). El precipitado resultante se resuspendió en 20-30 µL de *n*-butanol saturado con agua y se aplicó todo el volumen en puntos equidistantes en cromatoplasmas de sílica RP-18 F254s de 10 x 10 cm (Merck, Alemania).

La separación de los FN se llevó a cabo durante aproximadamente 45 minutos, empleando como fase móvil una mezcla polar de acetonitrilo:agua (AcN:H<sub>2</sub>O 1:1, v/v) preparada en el momento de su uso. Las placas de TLC se expusieron sobre películas radiográficas Fuji BAS-IIIIs (Japón) durante 7 días y se digitalizaron utilizando el sistema *Phosphor-image* (Fuji, Japón).

## Material y métodos para los estudios con plantas

### Plantas utilizadas en esta Tesis

Las plantas utilizadas en esta Tesis Doctoral fueron:

- *Phaseolus vulgaris* (Blue Bush Lake).
- *Leucaena leucocephala*.
- *Lotus japonicus* (Gifu).
- *Lotus burtii* (Borsos).

### Soluciones nutritivas para las plantas

Para el crecimiento de las plantas leguminosas se utilizó la solución de Fåhraeus carente de nitrógeno combinado (**Tablas 29 y 30**).

**Tabla 29 – Solución de Fåhraeus.**

Solución de Fåhraeus (Vincent, 1970)	
<b>CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O</b>	100 mg
<b>MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O</b>	120 mg
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	100 mg
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 H<sub>2</sub>O/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O</b>	150 mg/75 mg
<b>Citrato férrico*</b>	1 mL
<b>Solución de Gibson<sup>a</sup></b>	1 mL
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	Completar hasta 1 L

El pH del medio se ajustó a 6,5-7,0 y posteriormente se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C). \*El citrato férrico se preparó disolviendo con calor 5 g L<sup>-1</sup> de citrato férrico en H<sub>2</sub>O destilada.

**Tabla 30 – Solución de Gibson.**

a. Solución de Gibson	
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	2,86 g
<b>MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O</b>	2,08 g
<b>ZnSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O</b>	0,22 g

a. Solución de Gibson	
<b>CuSO<sub>4</sub> 5 H<sub>2</sub>O</b>	0,08 g
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub></b>	0,13 g
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	Completar hasta 1 L

## Desinfección y germinación de semillas

Las semillas de *P. vulgaris*, *L. leucocephala*, *L. japonicus* y *L. burttii* se desinfectaron mediante un tratamiento con etanol de 96 ° durante 30 segundos, seguido de otro con hipoclorito sódico al 6% (m/v) durante 6 minutos. Tras ello, las semillas se lavaron seis veces con abundante agua destilada estéril. Las semillas de *L. leucocephala*, *L. japonicus* y *L. burttii* se escarificaron con ácido sulfúrico 96-98% durante 10 minutos antes de su desinfección.

Las semillas desinfectadas se colocaron en placas de Petri que contenían agar-agua al 1% (m/v) y se incubaron en oscuridad a 28 °C hasta su germinación.

## Inoculación y cultivo de plantas: Jarro de Leonard (Vincent, 1970)

El sistema consiste en un depósito de aproximadamente 1,5 L que contiene solución de Fåhræus. Sobre este depósito se colocó una maceta que contenía 800 cm<sup>3</sup> de vermiculita mezclada con perlita (3:1) que previamente se humedeció con 250 mL de la misma solución nutritiva. La maceta y el depósito se conectaron mediante una mecha de algodón de aproximadamente 20 cm de longitud. El jarro completo se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C). En cada jarro se colocaron dos semillas en judía y leucena. Cada semilla se inoculó con 1 mL de cultivo bacteriano. En el caso de *L. japonicus* y *L. burttii*, los ensayos de nodulación se realizan en minijarros de Leonard (aproximadamente 200 cm<sup>3</sup> de vermiculita perlita 3:1 en la parte superior y un depósito de aproximadamente



de 200 mL que contenía la solución nutritiva). Para *L. burttii* y *L. japonicus* se colocaron 4 semillas por jarro. Cada semilla se inoculó con de 500 µL de cultivo bacteriano.

## Sistema de hidroponía en tubo: ensayos de actividad biológica de los FN

Los ensayos de actividad biológica de los FN en judía se llevaron a cabo en un sistema de hidroponía en tubo. Se usaron tubos de 2,5 cm x 24,5 cm a los que se les añadieron 30 mL de Fåhræus y se colocaron rejillas para colocar las semillas. Estos tubos se esterilizaron en el autoclave y posteriormente, se introdujo sobre la rejilla una semilla pregerminada por tubo. Los tubos se inocularon con 30 µL de la solución que contiene los FN purificados (ver apartado anterior). Los tubos se cerraron con papel y las plantas se dejaron crecer 10 días. Las condiciones de la cámara de cultivo fueron de 16 horas de luz (con intensidad de  $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 26 °C y 8 horas a 18 °C en oscuridad, con 70% de humedad. Para determinar la presencia de primordios nodulares, las raíces se lavaron con hipoclorito de sodio y se tiñieron con azul de metileno siguiendo el método de Truchet *et al.* (1989). Cada experimento se repitió tres veces con seis plantas para cada tratamiento.

## Ensayos de nodulación

Estos ensayos se realizaron para analizar las propiedades simbióticas de las distintas estirpes estudiadas en esta Tesis. Estos ensayos se llevaron a cabo en cámaras de plantas con un fotoperíodo de 16 horas de luz (con intensidad de  $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y 8 horas de oscuridad a 26 °C y 18 °C, respectivamente. En los ensayos con las plantas de *P. vulgaris*, se mantuvieron en la cámara de plantas durante 25-30 días, mientras que se dejaron entre 40-55 días para *L. leucocephala* y *Lotus*.

Para determinar la eficiencia de nodulación se cuantificó el número de nódulos (NN) formados en cada planta. Además, también se cuantificó el peso seco de la parte aérea (PSPA). Para ello, las partes aéreas de las plantas se secaron en una estufa

para desecación (J.P. Selecta, España) a 80 °C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se dejaron otras 24 horas con el horno apagado y ventilación cerrada para evitar su rehidratación y, por último, se pesaron.

### Aislamientos de las bacterias de los nódulos

Los nódulos se separaron de las raíces y se desinfectaron mediante un tratamiento con hipoclorito al 12% durante 2 o 3 minutos. A continuación, se lavaron con abundante agua destilada y se rodaron en cajas de medio TY para comprobar que la superficie del nódulo no presentaba bacterias. Posteriormente, los nódulos se machacaron en condiciones asépticas mediante el uso de una espátula estéril y su contenido se sembró en placas de TY para obtener colonias aisladas. Una vez crecidas, distintas colonias se sembraron en placas de TY suplementadas con los antibióticos apropiados para identificar las bacterias aisladas del nódulo.

Para evaluar la ocupación del nódulo en los ensayos de competitividad en los que se inocularon dos estirpes de rizobios en proporción 1:1, se analizaron 200 nódulos de ocho plantas (25 nódulos por planta). Estos experimentos se realizaron para determinar la competitividad entre CIAT 899 y el mutante *nrcR::Ω* (Spc<sup>R</sup>). Las colonias aisladas de los nódulos se sembraron en medio TY suplementado con rifampicina (control) y TY suplementado con rifampicina y espectinomicina para discriminar entre las dos estirpes.

### Estimación de la actividad nitrogenasa

Para determinar si *R. tropici* CIAT 899 podía fijar nitrógeno en vida libre se utilizó la Técnica de la Reducción del Acetileno (ARA, del inglés *Acetylene Reduction Assay*) tal y como se describe en Buendía-Clavería *et al.* (1986), empleándose un cromatógrafo de gases 5890A (Hewlett Packard, EEUU). Esta técnica permite realizar una medida de la capacidad de la enzima nitrogenasa para reducir el acetileno a etileno, que es una medida indirecta de la fijación biológica del nitrógeno (Turner y Gibson, 1980).

Para llevar a cabo esta medida, se cultivó una colonia de *R. tropici* CIAT 899 durante 72 horas a 28 °C en medio NFb con agar blando (0,4% agar) para simular condiciones de microaerobiosis. *A. brasilense* Ab-V6 se utilizó como control positivo para este ensayo, ya que se sabe que fija nitrógeno en condiciones de vida libre y en microaerobiosis.



# RESULTADOS

---



## Análisis transcriptómico de *R. tropici* CIAT 899 en presencia de flavonoides y estrés osmótico

### Antecedentes

*R. tropici* CIAT 899 es una estirpe de rizobio que se caracteriza por su capacidad para producir FN en presencia de estrés osmótico (NaCl) (Estévez *et al.*, 2009; Guasch-Vidal *et al.*, 2013). No obstante, se desconoce por qué una alta concentración de NaCl (300 mM NaCl) induce la síntesis de FN en esta bacteria. En la presente Tesis Doctoral, se quiso comprobar en primer lugar, si otro estrés osmótico diferente al estrés salino induce también la síntesis de FN en este rizobio.

Teniendo en cuenta que se conoce el genoma de CIAT 899 desde el año 2012 (Ormeño-Orillo *et al.*, 2012) parecía interesante, también de cara a los estudios transcriptómicos que se pretendían abordar, identificar las NB presentes en el genoma de la bacteria. Así, con las herramientas que se describen en Material y Métodos, se detectaron hasta 10 NB diferentes, todas ellas localizadas en el plásmido simbiótico (**Figura 12**).

Estas NB mostraron este patrón consenso: **ATN<sub>11</sub>ATN<sub>7</sub>ATN<sub>2</sub>AN<sub>4</sub>ATN<sub>2</sub>ATTNTN<sub>7</sub>**. Los genes localizados aguas debajo de estas NB fueron:

- NB1: *nodA1BCSUIJHPQ*.
- NB2: *nodA2hsnTnodFE*.
- NB3: *nodM*.
- NB4: *y4wEF*.
- NB5: *RTCIAT899\_PB01550* y *RTCIAT899\_PB01545*.
- NB6: *RTCIAT899\_PB00370* y *RTCIAT899\_PB00375*.
- NB7: *RTCIAT899\_PB01055*.
- NB8: *RTCIAT899\_PB00495*.
- NB9: *nodD2*.
- NB10: *RTCIAT899\_PB00540*.

NB1	1	CATTCAAGATGTGGATGGTTGCCATCCAAACAATCAATTTTACCGATTC--
NB2	1	CATTCAATCGCATGGATGCGCCACATCCAAATTAATCGATTTTACGAATTA--
NB3	1	AATCCATGACGTAAATGGGTGGGATCCAAAGAAATCGATTTTTCCTAATA--
NB4	1	CATCCGACATTTGGATGAGTCTTATTAATCAATCGATTATCCCATGCG--
NB5	1	TATCCATATCGTAAATAAGCGTTATCTAAACAATAAATT-TGCAAAACGAA-
NB6	1	CATCCATTGCTTAGATCATTTGGGATCCCAACCAATCAATTTTACCGATCT--
NB7	1	AATTGATGCCGTGGATGTGTGCTATTCAAACAATCGATTTTTCGGAATTG--
NB8	1	CATGCCGGCCGCGAATTGTATTTCATTCAAACAATCAATTTTACGCAGCG--
NB9	1	AATCGATTGTTTGAATAGCACACATCCACGGCATCAATT-TACACGCTAA-
NB10	1	CATTTGCGAAACGAATTGGTCTTATCCAAACAATCGATTTT--CAATCGCC
consensus	1	.**.....**.....**..*.....**..***.*.....

**Figura 12 – Alineación de las secuencias correspondientes a las NB de *R. tropici* CIAT 899. Los residuos marcados con negro y gris indican nucleótidos idénticos y similares, respectivamente. En el *consensus* se marcan los nucleótidos altamente conservados en las diez NB.**

## Expresión de los genes de *nod* en presencia de diferentes estreses osmóticos

Una forma sencilla y rápida de comprobar la expresión de los genes *nod* es midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa de CIAT 899 portando el plásmido pMP240 en las diferentes condiciones que se quieran estudiar. Este plásmido porta el promotor conservado del gen *nodA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* clonado aguas arriba del gen *lacZ* carente de su propio promotor de forma que, la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa codificada por el gen *lacZ*, depende de la actividad del promotor del gen *nodA*. Una vez transferido por conjugación este plásmido a CIAT 899, se realizaron ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en presencia de diferentes condiciones, entre las que se incluyeron tres condiciones de estrés osmótico (una condición de estrés iónico: NaCl, y dos de estrés no iónico: manitol y sacarosa) y otra condición control, en presencia de apigenina, el flavonoide inductor de los genes *nod* de CIAT 899. Las concentraciones de las distintas sustancias se muestran en la siguiente **Tabla 31**.

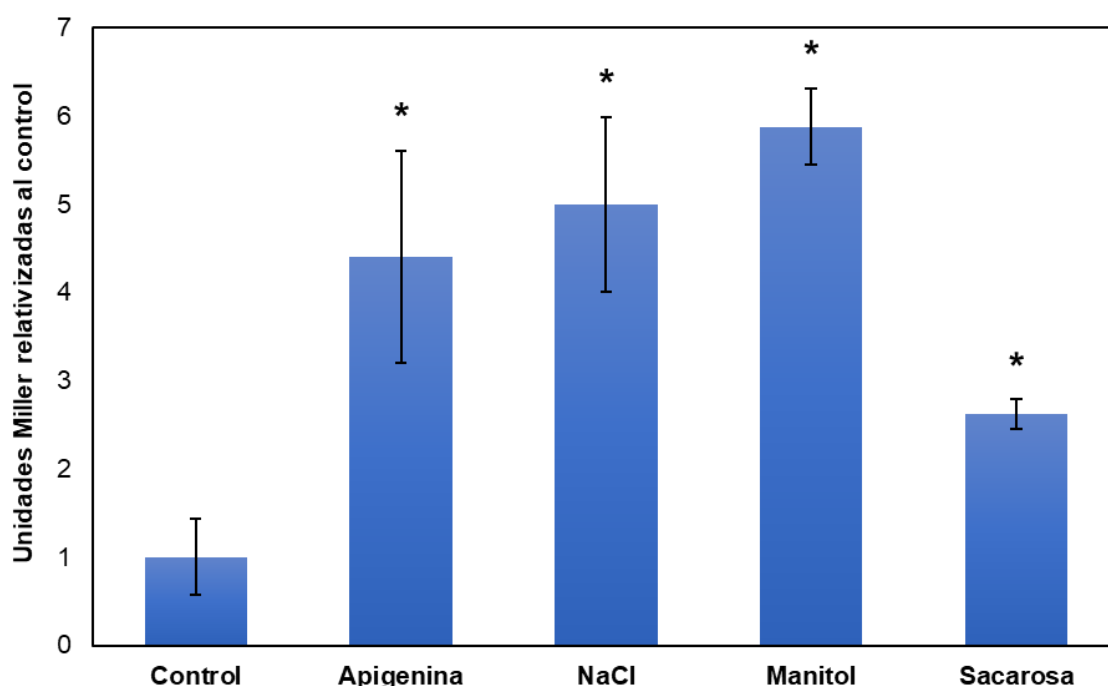
**Tabla 31 – Condiciones utilizadas en los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa utilizando la estirpe *R. tropici* CIAT 899 (pMP240).**

Medio utilizado	Condición	Observaciones
YM3	NaCl 300 mM	Estrés osmótico iónico
YM3	Manitol 400 mM	Estrés osmótico no iónico



Medio utilizado	Condición	Observaciones
YM3	Sacarosa 400 mM	Estrés osmótico no iónico
YM3	Apigenina 3.7 $\mu$ M	Flavonoide inductor de los genes <i>nod</i>

Los resultados obtenidos en estos ensayos de  $\beta$ -galactosidasa mostraron que, además de la ya conocida activación de los genes *nod* que se produce en presencia de apigenina y estrés salino, en presencia de manitol y sacarosa (estreses osmóticos no iónicos) los niveles de activación de los genes *nod* son significativamente superiores a las condiciones control sin inducir (**Figura 13**). De hecho, los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa son similares en las condiciones de estrés por manitol, estrés salino y apigenina, mientras que, en presencia de sacarosa, aunque los niveles son superiores a los observados en condiciones control, no alcanzaron los niveles de inducción observados en el resto de los tratamientos.



**Figura 13** – Ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en la estirpe *R. tropici* CIAT 899 (pMP240) en condiciones control (YM3), apigenina (3,7  $\mu$ M), NaCl (300 mM), manitol (400 mM) y sacarosa (400 mM). Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos en el tratamiento control mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores marcados con \* son significativamente diferentes al nivel  $\alpha = 5\%$ .

Estos resultados de actividad  $\beta$ -galactosidasa indicaron que, además del flavonoide apigenina y del estrés salino, otros estreses osmóticos incluidos los no-iónicos (manitol y sacarosa), podrían estar activando la expresión de los genes *nod* y por tanto la producción de FN en *R. tropici* CIAT 899.

## Estudios transcriptómicos globales mediante ARNseq

Con el objetivo de profundizar en el estudio de la expresión diferencial de los genes simbióticos en aquellas condiciones donde se observaron niveles altos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en *R. tropici* CIAT 899, se realizaron estudios transcriptómicos globales mediante ARNseq. Las condiciones para llevar a cabo estos estudios se eligieron en base a los resultados obtenidos en los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa del apartado anterior (**Figura 13**):

- Control (TY).
- Apigenina (TY + 3,7  $\mu$ M apigenina).
- Estrés osmótico iónico (TY + 300 mM NaCl)
- Estrés osmótico no iónico (TY + 400 mM manitol)

Tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos, se realizaron dos extracciones de ARN independientes por cada condición. Así, se extrajo el ARN total de las diferentes muestras y a continuación se purificó el ARNm. Las muestras se enviaron a la empresa Sistemas Genómicos SL (España) la cual llevó a cabo la secuenciación y los análisis bioinformáticos. Todos los resultados en número de transcritos se compararon uno a uno con las condiciones control sin inducir (medio TY).

Los resultados obtenidos en este estudio transcriptómico mostraron que, de los 6289 genes presentes en el genoma de CIAT 899, solo 19 genes se expresaron diferencialmente en presencia de flavonoide apigenina (0,3% del total). Sin embargo, 790 genes se expresaron diferencialmente bajo 300 mM de NaCl (12,5% del total). Para considerar que un gen se expresó diferencialmente se eligió un umbral de  $\pm 4$

veces de expresión (o *Fold change*) con respecto al control sin inducir. Por otra parte, en el caso de los estudios de ARNseq en presencia de manitol, el umbral elegido para considerar a un gen diferencialmente diferenciado fue de  $\pm 2.5$  veces de expresión. En este contexto, en presencia de 400 mM de manitol se expresaron diferencialmente 743 genes, lo que supone un 11,8% de los genes totales de la bacteria.

No es de extrañar el elevado número de genes diferencialmente expresados en condiciones de estrés osmótico, ya que la expresión diferencial de la mayoría de estos genes estuvo relacionada con la adaptación del rizobio tolerar el estrés osmótico en cuestión. No obstante, el número de genes diferencialmente expresados en presencia de flavonoide apigenina fue menor al observado en otros rizobios, como por ejemplo en la estirpe *S. fredii* HH103 (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b), indicando que, en un principio, la maquinaria simbiótica de CIAT 899 en respuesta a flavonoide podría estar controlada bajo un número limitado de genes.

### *Validación de datos de transcriptómica por qRT-PCR.*

Para validar los datos de expresión diferencial obtenidos mediante ARNseq, se realizaron ensayos de qRT-PCR de determinados genes en las diferentes condiciones de estudio, y se compararon con los valores obtenidos en los ARNseq (**Figura 14**). Así, se seleccionaron en condiciones de presencia de apigenina y estrés salino hasta 19 genes (*araC1*, *rpsL*, *araC2*, *y4wE*, *y4wF*, *nodA2*, *hsnT*, *nodF*, *nodE*, *nodA1*, *nodB*, *nodC*, *nodS*, *nodU*, *nodI*, *nodJ*, *nodH*, *RTCIAT899\_PB01545*, *nodM*, *RTCIAT899\_PC04980*) para cada una las condiciones, mientras que bajo estrés osmótico por manitol se seleccionaron siete genes (*fixC*, *mtlD*, *nodA3*, *nodF*, *nifH*, *nodA2*, *mtlE*). En las tres condiciones, los valores obtenidos por ARNseq presentaron correlación positiva con los valores obtenidos en los ensayos de qRT-PCR, dando validez a los estudios transcriptómicos realizados.

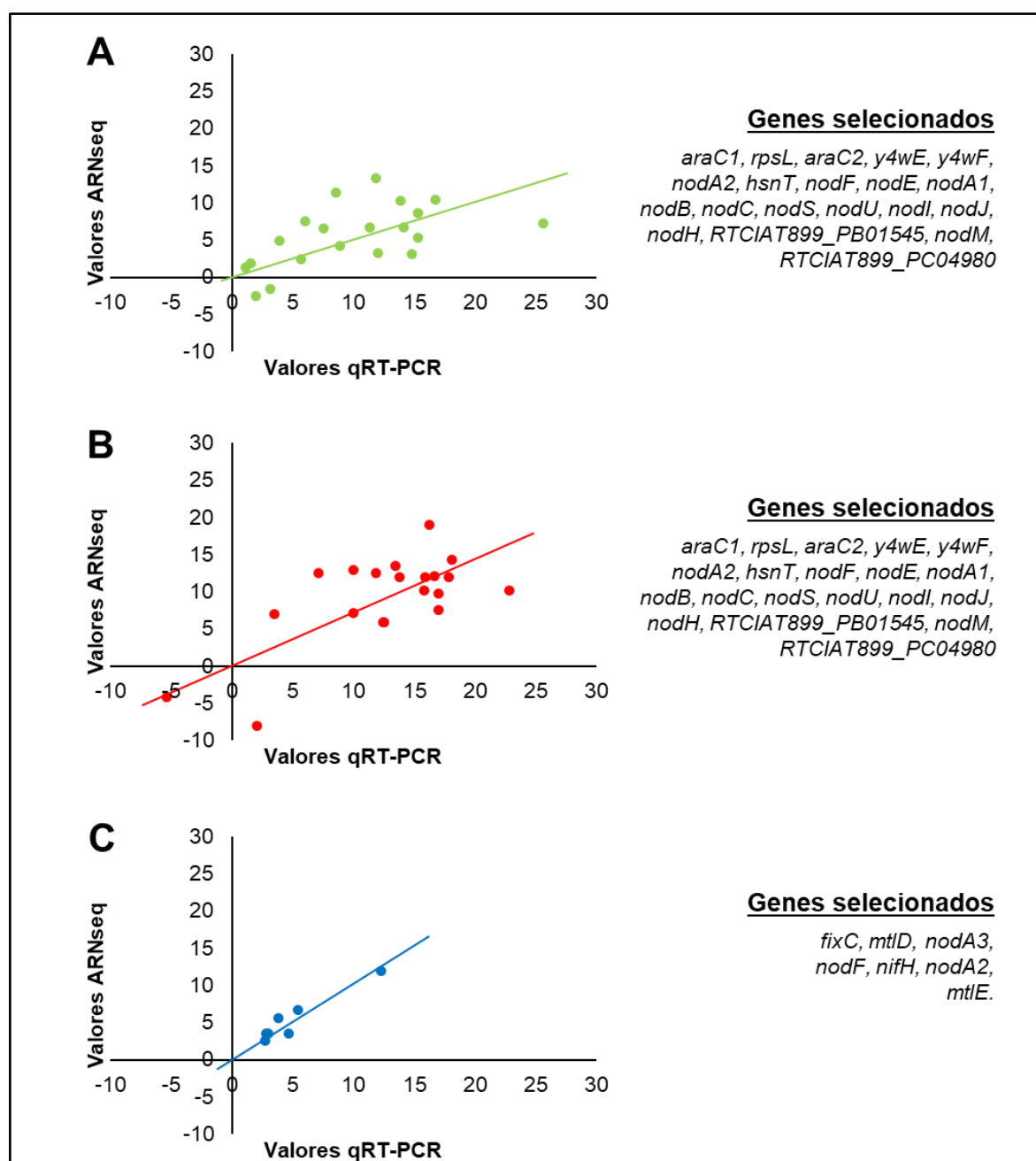


Figura 14 – Niveles de correlación entre los experimentos de ARNseq y qRT-PCR en las condiciones de apigenina (A), NaCl (B) y manitol (C). Se validaron para cada condición los genes indicados en la figura.

## Transcriptómica de *R. tropici* CIAT 899 en presencia del flavonoide apigenina.

Tras la secuenciación del ADNc, los resultados mostraron que un total de 19 genes se expresaron diferencialmente (0,3% del genoma total) en presencia de apigenina. De estos 19 genes, 15 de ellos estaban localizados en el plásmido simbiótico (pRtrCIAT899b). Los otros cuatro genes, que se reprimieron, dos se localizan en el

cromosoma de la bacteria, uno en el plásmido pRtrCIAT899a y otro en el plásmido pRtrCIAT899c (**Tabla 32**). De los 19 genes expresados diferencialmente, diez eran genes *nod* que se activaron diferencialmente en presencia de apigenina. En cambio, la expresión de los otros diez genes de nodulación (*nodD1-nodD5*, *nodH*, *nodP*, *nodQ*, *nodA3* y *nodM*) no alcanzó el umbral de expresión significativa determinado para este estudio ( $\pm 4$ ). Por otro lado, el gen *y4wE*, relacionado con la síntesis de la fitohormona ácido indolacético y que está precedido por la NB4, se indujo significativamente. Además, también se observó que otros dos genes que codifican para proteínas hipotéticas (*RTCIAT899\_PB01550* y *RTCIAT899\_PB01545*) y que están precedidos por la NB5 se indujeron diferencialmente. Por lo tanto, de las diez NB identificadas en CIAT 899, las NB1, NB2, NB4 y NB5 (cuatro de un total de diez) se activaron en presencia de flavonoide apigenina.

**Tabla 32 – Genes *nod* o regulados por una NB de *R. tropici* CIAT 899 diferencialmente expresados ( $\pm 4$ ) en 3,7  $\mu$ M de apigenina con respecto al control.**

Número de acceso NCBI	Gen	NB	Inducción apigenina	Función	Replicón
RTCIAT899_PB01300	<i>nodA1</i>	NB1	<b>8,73</b>	Síntesis FN	pB
RTCIAT899_PB01305	<i>nodB</i>	NB1	<b>11,4</b>	Síntesis FN	pB
RTCIAT899_PB01310	<i>nodC</i>	NB1	<b>6,69</b>	Síntesis FN	pB
RTCIAT899_PB01315	<i>nodS</i>	NB1	<b>7,53</b>	Síntesis FN	pB
RTCIAT899_PB01320	<i>nodU</i>	NB1	<b>5,39</b>	Síntesis FN	pB
RTCIAT899_PB01325	<i>nodI</i>	NB1	<b>6,59</b>	Síntesis FN	pB
RTCIAT899_PB01330	<i>nodJ</i>	NB1	<b>4,98</b>	Síntesis FN	pB
RTCIAT899_PB01095	<i>nodA2</i>	NB2	<b>10,3</b>	Síntesis FN	pB
RTCIAT899_PB01110	<i>hsnT</i>	NB2	<b>7,27</b>	Desconocida	pB
RTCIAT899_PB01115	<i>nodF</i>	NB2	<b>13,39</b>	Síntesis FN	pB
RTCIAT899_PB01120	<i>nodE</i>	NB2	<b>10,37</b>	Síntesis FN	pB
RTCIAT899_PB00575	<i>y4wE</i>	NB4	<b>8,58</b>	Síntesis AIA	pB
RTCIAT899_PB01550		NB5	<b>6,75</b>	Desconocida	pB
RTCIAT899_PB01545		NB5	<b>4,26</b>	Desconocida	pB
RTCIAT899_PB00585			<b>7,18</b>	Desconocida	pB
RTCIAT899_CH01400			<b>-5,41</b>	Desconocida	Cromosoma
RTCIAT899_CH01520			<b>-7,75</b>	Desconocida	Cromosoma

Número de acceso NCBI	Gen	NB	Inducción apigenina	Función	Replicón
RTCIAT899_PA00995	<i>traG</i>		<b>-6,56</b>	Transferencia de plásmido por conjugación	pA
RTCIAT899_PC06895			<b>-6.93</b>	Desconocida	pC

En rojo se muestran los genes reprimidos y en negro los activados. En cada caso se expresa las veces de inducción o de represión de cada gen con respecto al gen de la estirpe *R. tropici* CIAT 899 en condiciones control.

Curiosamente, uno de los genes que se reprimió en estas condiciones fue *traG*, gen relacionado con la transferencia de plásmidos, así como la de otros 3 genes de función desconocida, localizados dos de ellos en el cromosoma y uno en el pRtrCIAT899c.

## Transcriptómica de *R. tropici* CIAT 899 en presencia de estrés osmótico iónico (NaCl).

Tras secuenciar el ADNc de CIAT 899 en presencia de 300 mM de NaCl, se observó un mayor número de genes diferencialmente expresados con respecto a las condiciones de inducción con apigenina. En concreto, 790 genes se expresaron diferencialmente (12,5% del genoma), entre los que 646 se reprimieron y 144 se activaron. De estos 790 genes, 723 están localizados en el cromosoma, 31 en el plásmido simbiótico (pRtrCIAT899b) y 36 en el plásmido pRtrCIAT899c. Tal y como se esperaba, la función de la mayoría de los genes diferencialmente expresados en esta condición está relacionada con la resistencia a estrés salino. No obstante, distintos genes relacionados con el establecimiento de simbiosis con leguminosas también se expresaron diferencialmente. Entre éstos, se activaron 14 genes *nod* (más incluso que con apigenina, que fueron 10) (**Tabla 33**). De hecho, solo seis genes *nod* (*nodD1-nodD5* y *nodA3*) no alcanzaron el umbral de expresión determinado para este estudio. En esta ocasión, dos genes (*y4wE* e *y4wF*) relacionados con la síntesis de AIA y precedidos por la NB4 se sobreexpresaron. Además, los dos genes que codifican para proteínas hipotéticas (*RTCIAT899\_PB01550* y *RTCIAT899\_PB01545*) precedidos por la NB5 se expresaron diferencialmente de nuevo. Finalmente, llamó la atención un gen de función desconocida (*RTCIAT899\_PB01055*), cuya expresión está

regulada bajo la NB7, que se sobreexpresó tan solo en presencia de sal y no en presencia de flavonoide apigenina.

**Tabla 33 – Genes *nod*, de fijación de nitrógeno o regulados por una NB de *R. tropici* CIAT 899 diferencialmente activados ( $\pm 4$ ) en presencia de NaCl 300 mM.**

Número de acceso NCBI	Gen	NB	Inducción NaCl	Función	Replicón
RTCIAT899_PB01300	<i>nodA1</i>	NB1	13,66	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB01305	<i>nodB</i>	NB1	19,01	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB01310	<i>nodC</i>	NB1	12	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB01315	<i>nodS</i>	NB1	12,89	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB01320	<i>nodU</i>	NB1	10,18	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB01325	<i>nodI</i>	NB1	12,48	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB01330	<i>nodJ</i>	NB1	10,15	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB01340	<i>nodH</i>	NB1	7,6	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB01345	<i>nodP</i>	NB1	6,08	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB01350	<i>nodQ</i>	NB1	6,39	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB01095	<i>nodA2</i>	NB2	9,81	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB01110	<i>hsnT</i>	NB2	5,94	Desconocida	pB
RTCIAT899_PB01115	<i>nodF</i>	NB2	13,43	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB01120	<i>nodE</i>	NB2	11,94	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB02710	<i>nodM</i>	NB3	5,85	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB00575	<i>y4wE</i>	NB4	12,17	Síntesis AIA	pB
RTCIAT899_PB00570	<i>y4wF</i>	NB4	7,11	Síntesis AIA	pB
RTCIAT899_PB01550		NB5	28,65	Desconocida	pB
RTCIAT899_PB01545		NB5	14,37	Desconocida	pB
RTCIAT899_PB01055		NB7	5,68	Desconocida	pB
RTCIAT899_PB01565	<i>nifH</i>		4,87	Fijación Nitrógeno	pB

En cada caso se expresa las veces de inducción o de represión de cada gen con respecto al gen de la estirpe *R. tropici* CIAT 899 en condiciones control.

A pesar de que se ha descrito que la transcripción de los genes *nodD* es constitutiva, los niveles de expresión del gen *nodD2* en presencia de estrés salino presentaron una inducción de 3,01 (si bien, no fue suficiente para alcanzar el nivel de significación del estudio que se fijó en  $\pm 4$ ). Curiosamente, el gen *nodD2* es el único de los cinco que presenta CIAT 899 en su plásmido simbiótico que esta precedido por una caja de nodulación, la NB9. También llama la atención los niveles de inducción que se

observaron en estas condiciones para el gen *nifH* (4,87) que codifica para uno de los componentes de la nitrogenasa, relacionada con la fijación de nitrógeno. Finalmente, en cuanto a las NB, hasta seis NB (NB1-NB5 y NB7) de las diez detectadas en el plásmido simbiótico de CIAT 899, se activaron bajo estrés salino, más aún que en presencia de apigenina, donde solo se activaron cuatro.

## Transcriptómica de *R. tropici* CIAT 899 en presencia de estrés osmótico no-iónico (manitol).

La secuenciación del ADNc de CIAT 899 en presencia de 400 mM de manitol mostró unos resultados similares en algunos aspectos a los observados en la transcriptómica realizada en presencia de estrés salino (estrés osmótico iónico), si bien el umbral de activación se fijó en este análisis en  $\pm 2,5$ . En este estudio transcriptómico, se expresaron diferencialmente hasta 743 genes (11,8% del total), de los que 461 se activaron y 282 se reprimieron. Del total de genes diferencialmente expresados, 468 están localizados en el cromosoma bacteriano, 67 en el plásmido simbiótico (pRtrCIAT899b) y 208 en el plásmido pRtrCIAT899c. Tal y como sucedió en presencia de estrés salino, de nuevo la mayoría de los genes diferencialmente expresados están relacionados con la tolerancia al estrés osmótico. No obstante, ciertos genes relacionados con la simbiosis rizobio-leguminosa también se expresaron diferencialmente (**Tabla 34**). En este caso, solo se activaron cinco genes *nod* de los 20 que presenta CIAT 899 en su genoma. Tres de los cinco genes *nod* expresados diferencialmente (*nodA2*, *nodF* y *nodE*) están controlados por la NB2, mientras que los otros dos (*nodD1* y *nodA3*) carecen de NB. También se observó que los genes *RTCIAT899\_PB01550* y *RTCIAT899\_PB01545* (NB5) se activaron. Sin embargo, ninguno de los genes localizados bajo la NB1 (*nodA1BCSUIJHPQ*) se expresó diferencialmente bajo esta condición.



**Tabla 34 – Genes *nod*, de fijación de nitrógeno o regulados por una NB de *R. tropici* CIAT 899 diferencialmente activados ( $\pm 2,5$ ) en presencia de 400 mM de manitol.**

Número de acceso NCBI	Gen	NB	Inducción manitol	Función	Replicón
RTCIAT899_PB01295	<i>nodD1</i>		<b>4,63</b>	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB01095	<i>nodA2</i>	NB2	<b>2,57</b>	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB01115	<i>nodF</i>	NB2	<b>3,49</b>	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB01120	<i>nodE</i>	NB2	<b>2,72</b>	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB00645	<i>nodA3</i>		<b>3,59</b>	Síntesis NF	pB
RTCIAT899_PB01550		NB5	<b>3,95</b>	Desconocida	pB
RTCIAT899_PB01545		NB5	<b>4,01</b>	Desconocida	pB
RTCIAT899_PB01405	<i>nifT</i>		<b>5,04</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01420	<i>nifB</i>		<b>2,60</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01430	<i>fixX</i>		<b>4,26</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01435	<i>fixC</i>		<b>5,65</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01440	<i>fixB</i>		<b>5,91</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01445	<i>fixA</i>		<b>3,68</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01455	<i>nifS</i>		<b>3,23</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01460	<i>nifU</i>		<b>3,62</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01470	<i>nifQ</i>		<b>3,92</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01565	<i>nifH</i>		<b>11,90</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01570	<i>nifD</i>		<b>14,00</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01575	<i>nifK</i>		<b>10,71</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01580	<i>nifE</i>		<b>13,79</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01585	<i>nifN</i>		<b>10,48</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01590	<i>nifX</i>		<b>8,74</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01605	<i>fdxB</i>		<b>9,39</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01155	<i>fixO</i>		<b>8,75</b>	Fijación Nitrógeno	pB
RTCIAT899_PB01150	<i>fixN</i>		<b>7,55</b>	Fijación Nitrógeno	pB

En cada caso se expresa las veces de inducción o de represión de cada gen con respecto al gen de la estirpe CIAT 899 en condiciones control.

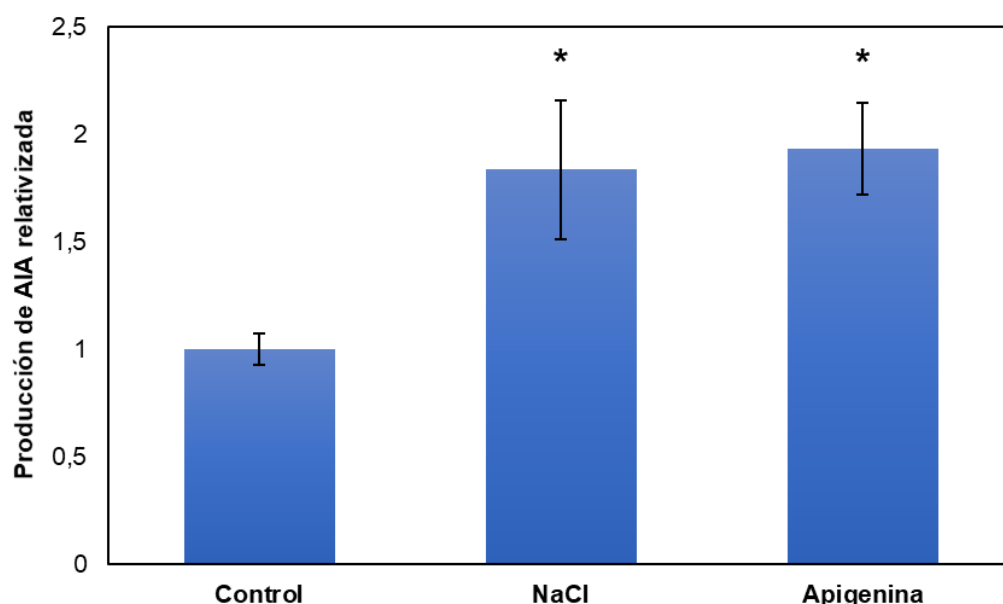
Sin embargo, un dato sorprendente de este estudio es el gran número de genes relacionados con la fijación de nitrógeno (hasta 18 genes) que se activaron (**Tabla 34**). No obstante, mediante ensayos de reducción de acetileno (ARA), se comprobó que la activación de los genes *nif* y *fix* no se tradujo en la capacidad de esta bacteria para fijar nitrógeno en presencia de 400 mM de manitol en vida libre, cosa que si hizo la estirpe AbV6 de *A. brasilense*, que se utilizó como control positivo y que fijó nitrógeno

tanto en presencia como en ausencia de 400 mM de manitol en medio NFb (datos no mostrados).

En ninguna de las condiciones ensayadas en los estudios transcriptómicos (apigenina y estrés osmótico) se activaron las NB6 y NB8-10. Puede ser que estas NB no sean funcionales o que se activen en ciertas condiciones que no se han ensayado.

### La producción de ácido indolacético (AIA) se induce en *R. tropici* CIAT 899 en presencia de apigenina y estrés salino.

Como se ha mostrado anteriormente, los genes *y4wE* e *y4wF*, que están implicados en la biosíntesis de la fitohormona AIA, se activan tanto en presencia de apigenina como en presencia de estrés salino. Tras observar en los estudios de ARNseq que la expresión de estos genes aumenta en presencia de apigenina o estrés salino, se decidió cuantificar la producción de AIA en estas condiciones inductoras (**Figura 15**).



**Figura 15 – Producción de AIA en *R. tropici* CIAT 899 en condiciones control, presencia de apigenina (3,7  $\mu$ M) o NaCl (300 mM). La producción de AIA relativa se calculó con respecto a la que se produjo en condiciones control. Las diferencias en cuanto a la producción de AIA relativa se calcularon siguiendo el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los \* indican una diferencia significativa al nivel de  $\alpha = 5\%$ .**

Los resultados mostraron que, en estas condiciones (apigenina y estrés salino), la producción de AIA aumenta hasta aproximadamente el doble de la detectada en condiciones control, correlacionándose con los datos de expresión diferencial que se observaron en los genes *y4wEF* en los estudios de ARNseq.

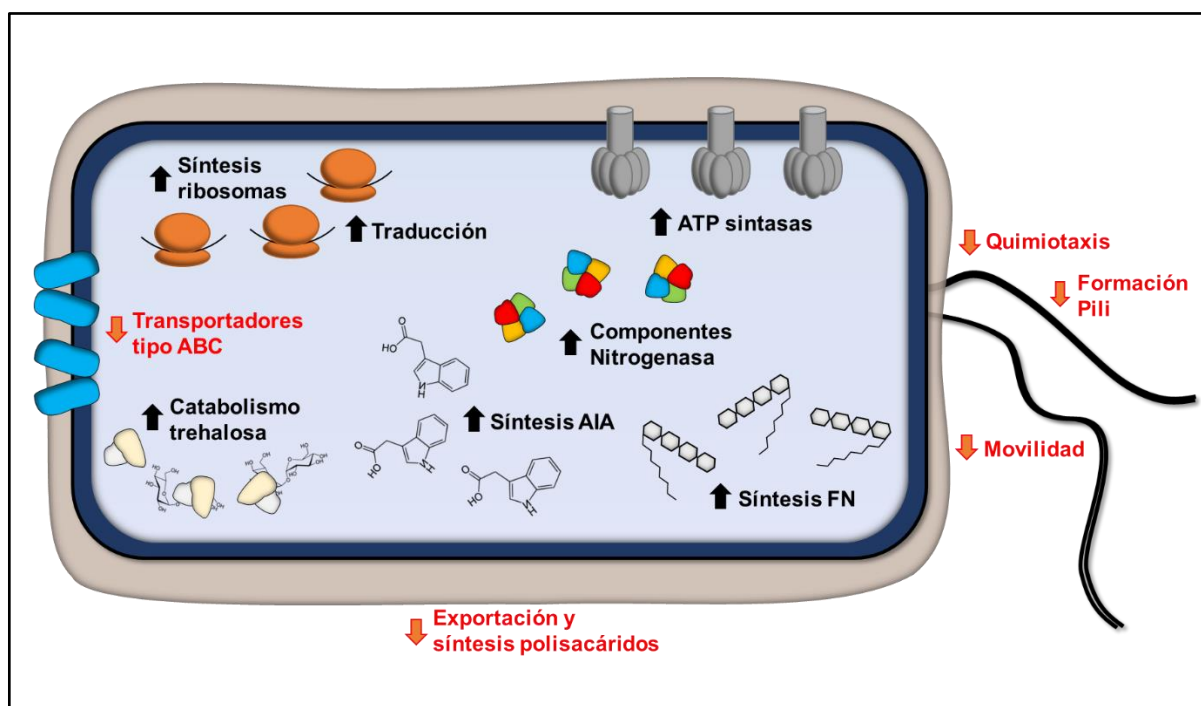
## Otros genes implicados en procesos bacterianos relevantes son también diferencialmente expresados en presencia de estrés osmótico

En presencia de estrés osmótico (estrés salino y estrés por manitol), un gran número de genes, la mayoría relacionados con la tolerancia a estrés, se expresaron diferencialmente. A continuación, se detallan los procesos activados o reprimidos más representativos en presencia de estrés salino (iónico) como estrés por manitol (no-iónico).

### *Procesos regulados en presencia de estrés osmótico iónico (NaCl)*

Además de los genes *nod*, genes regulados bajo una NB y el gen *nifH*, otros genes que podrían estar relacionados con el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa se expresaron diferencialmente en esta condición (**Figura 16**). Por un lado, se reprimieron los genes relacionados con la movilidad bacteriana, tanto implicados en la síntesis del flagelo (*flhB*) y quimiotaxis (*cheXYAWRBYD*), como en la formación de los pili de tipo IV (*tadBCD* y *cpaABCDEF*), indicando que CIAT 899 podría presentar una menor movilidad en estas condiciones de estrés. Por otro lado, también se reprimieron los genes relacionados con el transporte del KPS al exterior de la célula, como el gen *kpsE*. Además, el gen *psiB*, un represor de la síntesis de EPS, se activó 6,48 veces con respecto a las condiciones control. También, se activaron otros genes relacionados con la tolerancia a estrés osmótico, como los genes que codifican para las subunidades de los ribosomas (familia de genes *rpl* y *rps*) y para las subunidades de las ATP sintasas (familia de genes *atp*), indicando que CIAT 899 podría activar su metabolismo para sintetizar nuevas proteínas y obtener energía en forma de ATP en estas condiciones. Finalmente, se inhibieron un gran

número de genes que codifican para componentes de transportadores del tipo ABC (del inglés *Atp Binding Cassette*), como por ejemplo la familia de genes *phN*. Esto indica que CIAT 899 podría acumular osmolitos compatibles para tolerar el estrés salino. Sin embargo, también se observó que se activaron los genes *thuAB* implicados en el catabolismo de la trehalosa, un osmolito compatible en CIAT 899 (Fernández-Aunión *et al.*, 2010).

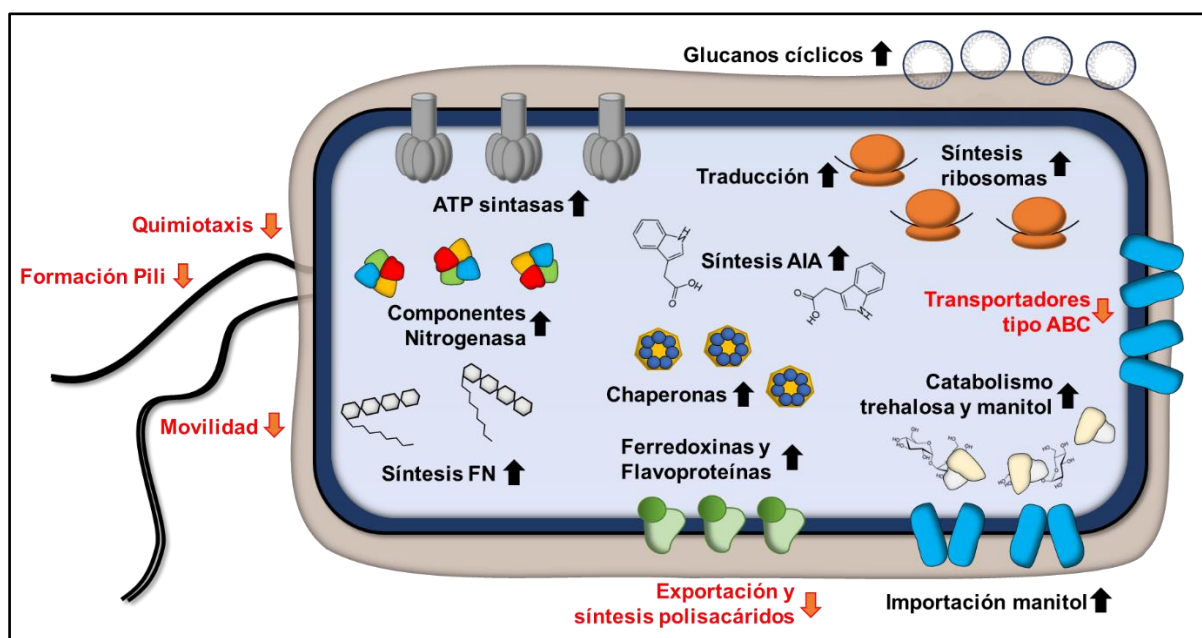


**Figura 16 – Principales procesos regulados diferencialmente en *R. tropici* CIAT 899 según los datos transcriptómicos llevados a cabo en condiciones de 300 mM de NaCl. En rojo se muestran los procesos reprimidos y en negro los activados.**

### *Procesos regulados en presencia de estrés osmótico no-iónico (manitol)*

Tal y como se comentó anteriormente, y a diferencia de lo que ocurre en presencia de estrés salino, en presencia de estrés osmótico no-iónico por manitol se observó que muchos genes relacionados con la fijación de nitrógeno (18 genes que codifican para componentes de la nitrogenasa, ferredoxinas y flavoproteínas) se activaron diferencialmente (**Tabla 34**). No obstante, en cuanto a los genes *nod*, solo cinco se expresaron diferencialmente con respecto a las condiciones control.

Además, otros procesos bacterianos se activaron o se reprimieron en presencia de este estrés osmótico. Por un lado, los genes relacionados con la movilidad, tanto de la síntesis de flagelo (genes *flg* y *fli*), movilidad del flagelo (genes *mot*), formación de los pili de tipo IV (*cpaEF* y *pilZ*) y quimiotaxis (*cheA*) también se inhibieron bajo estrés osmótico por manitol (**Figura 17**). Por otra parte, se reprimieron los genes relacionados con la exportación de los KPS (*kpsCE*) y la síntesis de EPS (*exoZ*), mientras que el gen que codifica para el inhibidor de la síntesis de polisacáridos (*psiB*) se activó. De manera específica, en estas condiciones de estrés osmótico no iónico, el gen *ndvA*, que está relacionado con la síntesis y transporte de los glucanos cíclicos ( $\beta$ -1,2), se activó. Por otro lado, tal y como ocurría bajo estrés salino, se activaron genes que codifican para las subunidades de los ribosomas (familia de genes *rpl* y *rps*) y para las subunidades de las ATP sintasas (familia de genes *atp*), indicando que CIAT 899 también induce su metabolismo para sintetizar nuevas proteínas y poder obtener energía en forma de ATP, lo que ayudaría a tolerar el estrés. De nuevo, se inhibieron un gran número de genes que codifican para componentes de transportadores del tipo ABC, lo que parece indicar que CIAT 899 también podría acumular osmolitos compatibles para tolerar el estrés osmótico no iónico.



**Figura 17 – Principales procesos regulados diferencialmente en *R. tropici* CIAT 899 según los datos transcriptómicos llevados a cabo en condiciones de 400 mM de manitol. En rojo se muestran los procesos reprimidos y en negro los activados.**

De igual manera que con el estrés salino, se activaron los genes que codifican para las proteínas que catabolizan la trehalosa (*thuAB*). Sin embargo, para tolerar el estrés osmótico CIAT 899 podría estar también acumulando glicerol, ya que se reprimió el gen *glpD* responsable del catabolismo de este compuesto. Además, tal y como se esperaba, en estas condiciones de estrés osmótico por altas concentraciones de manitol, se activaron genes relacionados con la importación y catabolismo del manitol, como los genes *mtlD* y *mtlE*. Por último, también llama la atención que, a diferencia del estrés salino, los genes que codifican para distintas chaperonas (*groEL*, *groES*, *dnaJ*, *grpE* y *hspG*) se activaron diferencialmente en este tipo de estrés, lo que indicaría que bajo estrés las chaperonas estarían manteniendo el plegamiento adecuado de las proteínas de esta bacteria.

## Estudio del papel simbiótico de los cinco reguladores NodD de *R. tropici* CIAT 899.

### Antecedentes

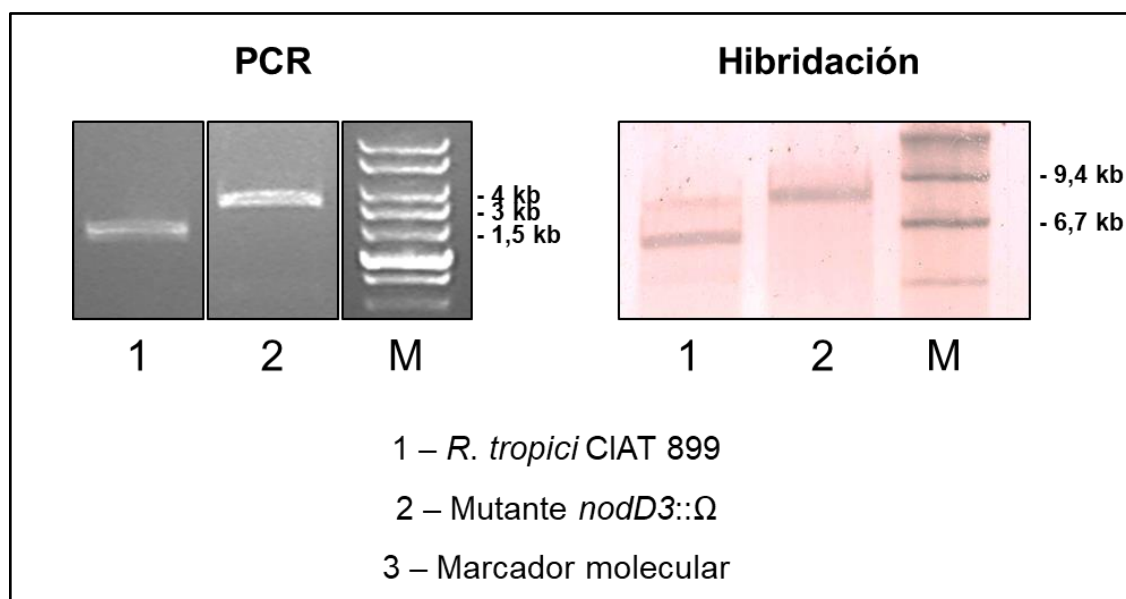
La secuenciación del genoma de *R. tropici* CIAT 899 mostró la presencia de hasta cinco reguladores transcripcionales NodD, característica atípica en el resto de los rizobios (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012). Por esto, se decidió estudiar el papel de las cinco copias del gen *nodD* y comprobar si alguna de ellas es responsable de la activación de los genes *nod* en presencia de estrés osmótico. Para ello, se decidió obtener, mediante mutagénesis dirigida utilizando el interposón  $\Omega$ , mutantes en cada una de las copias del gen *nodD* presentes en el plásmido simbiótico de CIAT 899. En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación se había obtenido un mutante por inserción del gen *nodD1* (estirpe RSP82), que era incapaz de producir FN en presencia de apigenina, y sí lo hacía en presencia de estrés salino (Guasch-Vidal *et al.*, 2013), lo que indicaba que NodD1 es responsable de la activación de los genes *nod* en presencia de flavonoides exclusivamente. Por tanto, se abordó la obtención de los mutantes en los genes *nodD2*, *nodD3*, *nodD4* y *nodD5*.

### Obtención de mutantes

Brevemente, para la obtención de estos mutantes se amplificaron por PCR las correspondientes secuencias génicas utilizando para ello dos cebadores externos a cada gen (ver Material y Métodos). A continuación, las secuencias amplificadas se clonaron en el vector pGEM-T Easy y, posteriormente, se clonó el interposón  $\Omega$  en puntos de corte únicos de cada gen *nodD*, para de esta forma interrumpir la fase de lectura abierta de cada gen *nodD*. Una vez obtenidas estas construcciones, se clonaron las mismas en el plásmido pK18*mob*, un plásmido no replicable en CIAT 899, por lo que podemos seleccionar procesos de doble recombinación homóloga en los que se sustituye la copia silvestre del gen de CIAT 899 por la copia interrumpida por el interposón  $\Omega$ . Esta copia es seleccionable porque el interposón porta un gen de resistencia a espectinomicina. Como se ha descrito en Material y Métodos, para



seleccionar copias con el interposón integrado en el gen y que no contenga el plásmido también integrado, se seleccionan colonias resistentes a espectinomicina y sensibles a kanamicina, gen de resistencia presente en el plásmido. Finalmente, la integración del interposón en cada una de las estirpes mutantes se confirmaron tanto por PCR como por experimentos de hibridación ADN-ADN. En la **Figura 18** se muestra la comprobación por PCR e hibridación del mutante *nodD3::Ω*.



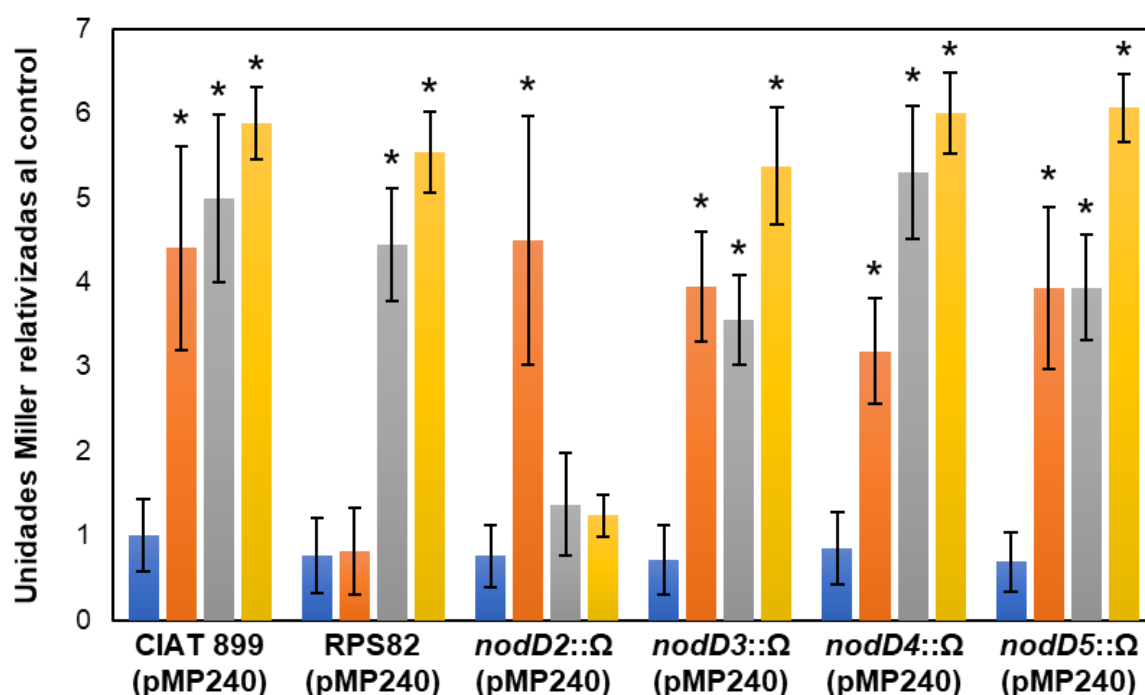
**Figura 18** – Ejemplo de comprobación por PCR e hibridación del mutante *nodD3::Ω* en *R. tropici* CIAT 899. En la hibridación, el ADN extraído del mutante *nodD3::Ω* fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI*.

NodD1 y NodD2 activan el promotor del gen *nodA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* en presencia de apigenina y estrés osmótico, respectivamente

Ya que el regulador transcripcional NodD regula la transcripción de los genes *nod*, el objetivo de este apartado fue estudiar la activación de los genes *nod* en el fondo mutante de los distintos genes *nodD* de CIAT 899, todo ello en presencia de apigenina, estrés salino (estrés osmótico iónico) y estrés por manitol (no iónico).



Por consiguiente, se quiso estudiar si el promotor de los genes de nodulación (*pnodA*) se activa o no en estos mutantes en estas condiciones. Para ello, se utilizó la estirpe CIAT 899 (pMP240) y las estirpes mutantes en los genes *nodD* que portaban, por conjugación triparental, el plásmido pMP240. A continuación, se realizaron ensayos de  $\beta$ -galactosidasa de CIAT 899 (pMP240) y sus derivados en las siguientes condiciones: control, apigenina, estrés salino (estrés osmótico iónico) y estrés por manitol (estrés osmótico no-iónico) (**Figura 19**).



**Figura 19** – Ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en la estirpe *R. tropici* CIAT 899 (pMP240) y los diferentes mutantes en los genes *nodD* (pMP240) en condiciones control (YM3, barras azules), apigenina 3,7  $\mu$ M (barras rojas), NaCl 300 mM (barras grises) y manitol 400 mM (barras amarillas). Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos en el tratamiento de CIAT 899 (pMP240) control mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores con \* son significativamente diferentes a nivel  $\alpha = 5\%$ .

En el apartado anterior, se observó en la **Figura 13** que los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa en la estirpe silvestre son significativamente superiores en presencia de apigenina, estrés salino y estrés por manitol, en comparación con las condiciones control. En el presente ensayo, los resultados mostraron que los niveles de actividad de la estirpe RSP82 (mutante en *nodD1*) en presencia de apigenina son similares a los obtenidos en las condiciones control sin inducir, mientras que, en presencia de estrés osmótico, la actividad no varió con respecto a la estirpe parental (**Figura 19**).

Por otra parte, la estirpe *nodD2::Ω* (pMP240) presentó niveles de actividad similares a las condiciones control sin inducir en presencia de estrés osmótico, mientras que la actividad  $\beta$ -galactosidasa en presencia de apigenina fue similar a la de la estirpe silvestre. Estos resultados mostraron que la proteína NodD1 es la responsable de la activación de los genes *nod* en presencia de flavonoide apigenina, y la proteína NodD2 la responsable de la activación de los genes *nod* en presencia de estrés osmótico iónico o no iónico.

Finalmente, las estirpes *nodD3::Ω*, *nodD4::Ω* y *nodD5::Ω* no produjeron cambios significativos en los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa con respecto a la estirpe silvestre en todas las condiciones ensayadas, por lo que podría ser que ninguno de estos genes esté implicado en la activación transcripcional de los genes *nod* en presencia de apigenina o estrés osmótico.

## Estudio transcriptómico de los mutantes RSP82 y *nodD2::Ω* en presencia de apigenina y estrés osmótico

A raíz de los resultados de actividad  $\beta$ -galactosidasa del apartado anterior, y ya que se disponía de los datos de ARNseq de la estirpe silvestre en presencia de flavonoide y estrés osmótico, se realizó un nuevo estudio transcriptómico de la estirpe RSP82 en presencia de apigenina y estrés salino; y de la estirpe *nodD2::Ω* en presencia de apigenina, estrés salino y estrés por manitol (**Figura 19**). La metodología y condiciones empleadas para este estudio fueron, en general, idénticas a las utilizadas anteriormente con la estirpe silvestre, donde se ha considerado a un gen diferencialmente diferenciado cuando la expresión es  $\pm 4$  veces en condiciones de apigenina y estrés salino, y  $\pm 2.5$  veces en presencia de estrés por manitol.

Los datos obtenidos en estos nuevos estudios transcriptómicos mostraron que, en presencia de apigenina, ninguno de los diez genes *nod* diferencialmente activados en la estirpe silvestre se activó en la estirpe RSP82, confirmando el papel de NodD1 en la activación de estos genes en presencia de apigenina (**Tabla 35**). Tampoco se

activaron los genes *y4wE* (NB4), *RTCIAT899\_PB01550* y *RTCIAT899\_PB01545* (NB5). En estas mismas condiciones, la expresión diferencial de los genes simbióticos del mutante *nodD2::Ω* no se vio afectada en presencia de apigenina, con la única excepción del gen *RTCIAT899\_PB01545*, que codifica para una proteína hipotética, y que se expresó menos que en la estirpe silvestre (4,26 vs 2,36).

**Tabla 35 – Expresión diferencial de todos los genes *nod* o regulados por NB y diferencialmente expresados en *R. tropici* CIAT 899 y sus derivados RSP82 y *nodD2::Ω* en presencia de 3,7  $\mu$ M de apigenina.**

Número de acceso NCBI	Gen	NB	Inducción CIAT 899	Inducción RSP82	Inducción <i>nodD2::Ω</i>
RTCIAT899_PB01295	<i>nodD1</i>		1,23	-1,29	-1,53
RTCIAT899_PB01070	<i>nodD2</i>	NB9	-1,25	-1,52	-7,93
RTCIAT899_PB00640	<i>nodD3</i>		-1,21	-1,39	1,32
RTCIAT899_PB01560	<i>nodD4</i>		1,09	-1,04	-1,16
RTCIAT899_PB00560	<i>nodD5</i>		-1,12	-1,24	-2,16
RTCIAT899_PB01300	<i>nodA1</i>	NB1	8,73	-2,08	10,85
RTCIAT899_PB01305	<i>nodB</i>	NB1	11,4	-1,12	12,33
RTCIAT899_PB01310	<i>nodC</i>	NB1	6,69	-1,72	5,96
RTCIAT899_PB01315	<i>nodS</i>	NB1	7,53	-2,27	5,59
RTCIAT899_PB01320	<i>nodU</i>	NB1	5,39	-1,37	6,48
RTCIAT899_PB01325	<i>nodI</i>	NB1	6,59	-2,47	5,2
RTCIAT899_PB01330	<i>nodJ</i>	NB1	4,98	-2,46	3,42
RTCIAT899_PB01340	<i>nodH</i>	NB1	3,09	-1,95	1,73
RTCIAT899_PB01345	<i>nodP</i>	NB1	2,78	-3,08	1,32
RTCIAT899_PB01350	<i>nodQ</i>	NB1	3,25	-2,31	1,79
RTCIAT899_PB01095	<i>nodA2</i>	NB2	10,3	1,41	8,29
RTCIAT899_PB01115	<i>nodF</i>	NB2	13,39	1,21	5,17
RTCIAT899_PB01120	<i>nodE</i>	NB2	10,37	-1,51	6,35
RTCIAT899_PB00645	<i>nodA3</i>		1,15	2,03	2,77
RTCIAT899_PB02710	<i>nodM</i>	NB3	2,43	-1,52	2,8
RTCIAT899_PB00575	<i>y4wE</i>	NB4	8,58	-2,94	4,25
RTCIAT899_PB01550		NB5	6,75	1,36	4,11
RTCIAT899_PB01545		NB5	4,26	1,43	2,36

En rojo se muestran los genes reprimidos y en negro los genes activados. En negrita se muestran los genes diferencialmente expresados ( $\pm 4$ ). En cada caso se expresa las veces de inducción o de represión de cada gen con respecto al gen de la estirpe *R. tropici* CIAT 899 en condiciones control.

En cuanto a los datos obtenidos en condiciones de estrés salino, de los 14 genes *nod* diferencialmente expresados en la estirpe silvestre, ninguno se indujo en el fondo mutante del gen *nodD2*, indicando que este regulador es el responsable de la activación transcripcional de los genes *nod* en presencia de estrés salino en CIAT 899 (**Tabla 36**). Tampoco se indujeron los genes *y4wEF*, *RTCIAT899\_PB01550* y *RTCIAT899\_PB01545* en el mutante *nodD2::Ω* bajo estrés salino.

En cuanto al mutante RSP82 (mutante en *nodD1*), se observó que los genes regulados bajo las NB1, NB3 y NB4 no se activaban en condiciones de estrés salino. Sin embargo, sí se observó cierta activación transcripcional en el operón controlado por la NB2 (genes *nodA2FE*) y la NB5 (*RTCIAT899\_PB01550* y *RTCIAT899\_PB01545*). Este resultado podría indicar que NodD1 podría estar también implicado en la activación de ciertos genes *nod* en presencia de estrés salino, o bien que podría estar promoviendo la transcripción de *nodD2* en estas condiciones. Esta última hipótesis se apoya en el hecho de que, en presencia de 300 mM de NaCl, el gen *nodD2* controlado por la NB9 se activa 3,01 veces en la estirpe silvestre, mientras que en el mutante RSP82 presenta unos valores de inducción de 1,02 (**Tabla 36**).

**Tabla 36 – Expresión diferencial de todos los genes *nod* o regulados por NB y diferencialmente expresados en *R. tropici* CIAT 899 y los mutantes RSP82 y *nodD2::Ω* en presencia de 300 mM de NaCl con respecto a la estirpe parental en condiciones control.**

Número de acceso NCBI	Gen	NB	Inducción CIAT 899	Inducción RSP82	Inducción <i>nodD2::Ω</i>
RTCIAT899_PB01295	<i>nodD1</i>		1,04	-1,24	1,06
RTCIAT899_PB01070	<i>nodD2</i>	NB9	3,01	1,02	-3,29
RTCIAT899_PB00640	<i>nodD3</i>		2,1	1,4	1,53
RTCIAT899_PB01560	<i>nodD4</i>		1,16	1,29	1,56
RTCIAT899_PB00560	<i>nodD5</i>		-1,09	1,11	-1,04
RTCIAT899_PB01300	<i>nodA1</i>	NB1	13,66	2,63	-1,13
RTCIAT899_PB01305	<i>nodB</i>	NB1	19,01	3,46	1,29
RTCIAT899_PB01310	<i>nodC</i>	NB1	12	2,43	1,19
RTCIAT899_PB01315	<i>nodS</i>	NB1	12,89	2,16	1,03
RTCIAT899_PB01320	<i>nodU</i>	NB1	10,18	2,91	1,56
RTCIAT899_PB01325	<i>nodI</i>	NB1	12,48	1,94	1,36

Número de acceso NCBI	Gen	NB	Inducción CIAT 899	Inducción RSP82	Inducción <i>nodD2::Ω</i>
RTCIAT899_PB01330	<i>nodJ</i>	NB1	<b>10,15</b>	1,71	-1,06
RTCIAT899_PB01340	<i>nodH</i>	NB1	<b>7,6</b>	1,96	1,08
RTCIAT899_PB01345	<i>nodP</i>	NB1	<b>6,08</b>	-1,31	-1,75
RTCIAT899_PB01350	<i>nodQ</i>	NB1	<b>6,39</b>	-1,01	-1,33
RTCIAT899_PB01095	<i>nodA2</i>	NB2	<b>9,81</b>	<b>4,14</b>	1,08
RTCIAT899_PB01115	<i>nodF</i>	NB2	<b>13,43</b>	<b>4,16</b>	1,612
RTCIAT899_PB01120	<i>nodE</i>	NB2	<b>11,94</b>	<b>4,11</b>	1,47
RTCIAT899_PB00645	<i>nodA3</i>		3,36	1,91	2,82
RTCIAT899_PB02710	<i>nodM</i>	NB3	<b>5,85</b>	1,68	1,32
RTCIAT899_PB00575	<i>y4wE</i>	NB4	<b>12,17</b>	1,88	-1,13
RTCIAT899_PB00570	<i>y4wF</i>	NB4	<b>7,11</b>	1,04	-1,3
RTCIAT899_PB01550		NB5	<b>28,65</b>	<b>7,72</b>	1,97
RTCIAT899_PB01545		NB5	<b>14,37</b>	<b>4,73</b>	1,43

En rojo se muestran los genes reprimidos y en negro los genes activados. En negrita se muestran los genes diferencialmente expresados ( $\pm 4$ ). En cada caso se expresa las veces de inducción o de represión de cada gen con respecto al gen de la estirpe *R. tropici* CIAT 899 en condiciones control.

Finalmente, con respecto a los resultados de ARNseq en presencia de estrés osmótico no iónico (manitol), de los genes *nod* o regulados por NB, diferencialmente expresados en la estirpe silvestre (*nodD1*, *nodA2*, *nodF*, *nodE*, *nodA3*, *RTCIAT899\_PB01550* y *RTCIAT899\_PB01545*), solo los genes *nodF* y *RTCIAT899\_PB01550* se indujeron diferencialmente en el fondo mutante del gen *nodD2*, sugiriendo que el regulador NodD2 sería el responsable de la activación transcripcional de estos genes en presencia de altas concentraciones de manitol (**Tabla 37**).

**Tabla 37 - Expresión diferencial de todos los genes *nod* o regulados por NB y diferencialmente expresados en *R. tropici* CIAT 899 y el mutante *nodD2::Ω* en presencia de 400 mM de manitol con respecto a la estirpe parental en condiciones control.**

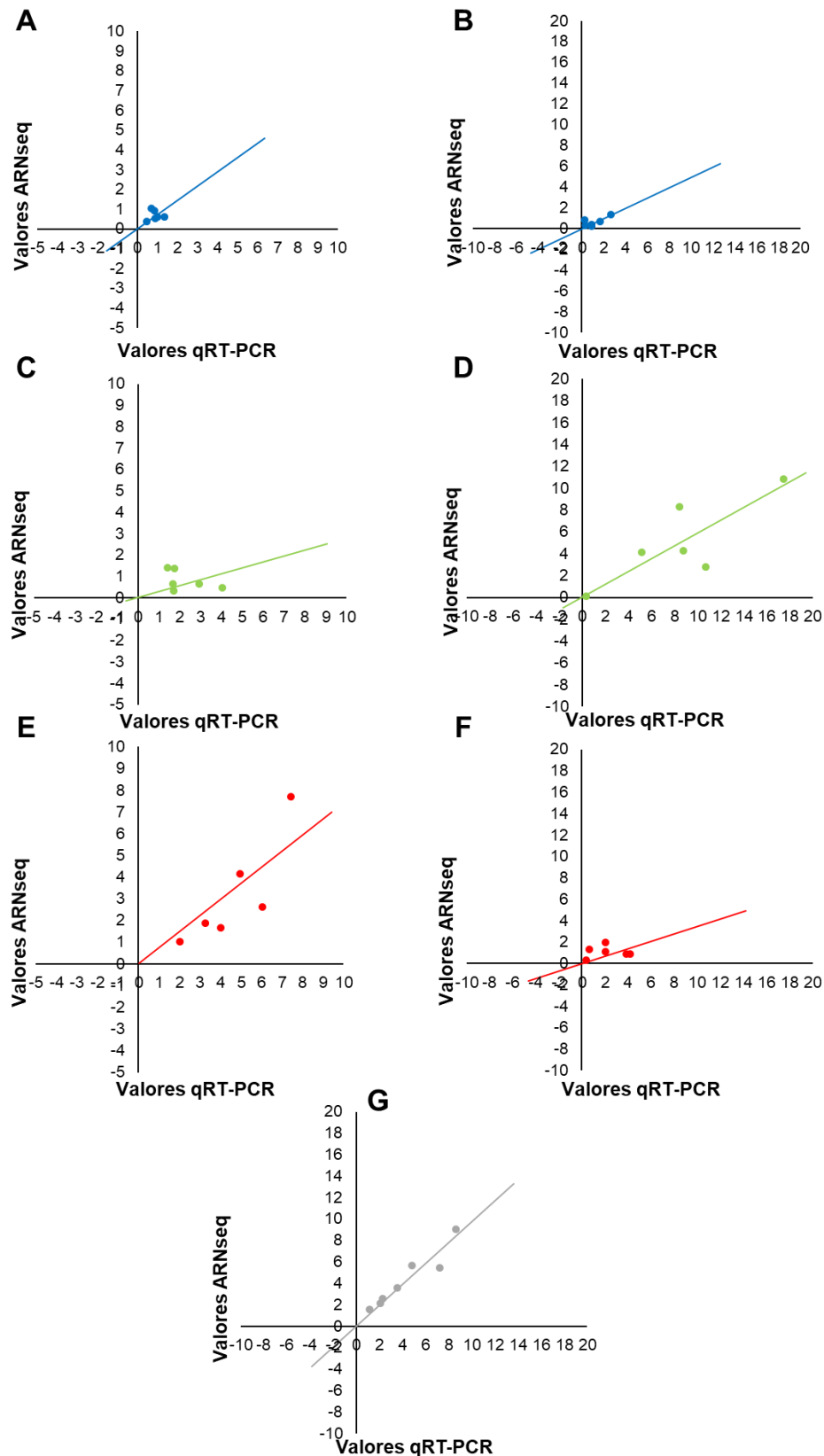
Número de acceso NCBI	Gen	NB	Inducción CIAT 899	Inducción <i>nodD2::Ω</i>
RTCIAT899_PB01295	<i>nodD1</i>		<b>4,63</b>	1,88
RTCIAT899_PB01070	<i>nodD2</i>	NB9	2,28	-1,91
RTCIAT899_PB00640	<i>nodD3</i>		1,6	1,38
RTCIAT899_PB01560	<i>nodD4</i>		1,48	1,5

Número de acceso NCBI	Gen	NB	Inducción CIAT 899	Inducción <i>nodD2::Ω</i>
RTCIAT899_PB00560	<i>nodD5</i>		1,84	1,25
RTCIAT899_PB01300	<i>nodA1</i>	NB1	-1,15	1,08
RTCIAT899_PB01305	<i>nodB</i>	NB1	2,07	2,09
RTCIAT899_PB01310	<i>nodC</i>	NB1	1,47	1,27
RTCIAT899_PB01315	<i>nodS</i>	NB1	1,45	1,12
RTCIAT899_PB01320	<i>nodU</i>	NB1	2,10	1,51
RTCIAT899_PB01325	<i>nodI</i>	NB1	1,71	1,22
RTCIAT899_PB01330	<i>nodJ</i>	NB1	1,29	-1,15
RTCIAT899_PB01340	<i>nodH</i>	NB1	1,38	1,36
RTCIAT899_PB01345	<i>nodP</i>	NB1	-1,07	-1,03
RTCIAT899_PB01350	<i>nodQ</i>	NB1	-1,34	-1,47
RTCIAT899_PB01095	<i>nodA2</i>	NB2	2,57	1,57
RTCIAT899_PB01115	<i>nodF</i>	NB2	3,49	2,59
RTCIAT899_PB01120	<i>nodE</i>	NB2	2,72	1,99
RTCIAT899_PB00645	<i>nodA3</i>		3,59	2,14
RTCIAT899_PB02710	<i>nodM</i>	NB3	2,30	1,15
RTCIAT899_PB01550		NB5	3,95	3,45
RTCIAT899_PB01545		NB5	4,01	2,46

En rojo se muestran los genes reprimidos y en negro los genes activados. En negrita se muestran los genes diferencialmente expresados ( $\pm 2,5$ ). En cada caso se expresa las veces de inducción o de represión de cada gen con respecto al gen de la estirpe *R. tropici* CIAT 899 en condiciones control.

## Validación de datos de transcriptómica por qRT-PCR.

Como se hizo en el apartado anterior, se validaron los datos obtenidos en ARNseq por medio de qRT-PCR (**Figura 20**). En las dos estirpes mutantes y en todas las condiciones, los valores obtenidos por ARNseq presentaron correlación positiva con los valores obtenidos en los ensayos de qRT-PCR, dando validez a los estudios transcriptómicos realizados.



**Figura 20 – Niveles de correlación entre los experimentos de ARNseq y qRT-PCR en los mutantes RSP82 (A, C, E) y *nodD2::Ω* (B, D, F, G) en condiciones control (A, B), en presencia de apigenina (C, D), estrés salino (E, F) y estrés osmótico por manitol (G). Para A-F se validaron los genes *nodA1*, *nodA2*, *nodM*, *y4wE*, *RTCIAT899\_PB01550* y *nodD2*, mientras que para G se validaron los genes *fixC*, *mtlD*, *nodA3*, *nodF*, *nifH*, *nodA2*, *mtlE*.**

## Determinación por espectrometría de masas de los FN producidos en apigenina y estrés salino en CIAT 899 y mutantes *nodD*

Tras estudiar la activación de los genes de nodulación, se analizaron los FN de la estirpe CIAT 899 y las estirpes mutantes en los genes *nodD* mediante ensayos de espectrometría de masas en condiciones control (medio B<sup>-</sup>), apigenina (medio B<sup>-</sup> + 3,7  $\mu$ M) y bajo estrés salino (medio B<sup>-</sup> + NaCl 300 mM). En la **Tabla 38** se muestra el número de FN producidos en las distintas condiciones de cultivo en cada uno de los mutantes *nodD*. La estructura de los FN sintetizados por las estirpes estudiadas en las distintas condiciones se muestra en los **Anexos 1-3** de esta Tesis Doctoral.

**Tabla 38 – Número total de FN producidos por la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 y los mutantes en los genes *nodD* en condiciones control, NaCl 300 mM y apigenina 3,7  $\mu$ M.**

Condición	CIAT 899	RSP82	<i>nodD2::</i> $\Omega$	<i>nodD3::</i> $\Omega$	<i>nodD4::</i> $\Omega$	<i>nodD5::</i> $\Omega$
<b>Control</b>	11	11	10	2	15	8
<b>NaCl</b>	36	20	18	25	38	26
<b>Apigenina</b>	29	20	25	21	22	30

En estos resultados llamó la atención la presencia de diferentes FN en condiciones control donde no hay ningún inductor de CIAT 899, al igual que se detectó en Guasch-Vidal *et al.* (2013). Sorprendentemente, en condiciones control el mutante *nodD3::* $\Omega$  produjo únicamente dos FN frente a los 11 que produjo la estirpe silvestre, lo que podría sugerir que NodD3 tuviera una función activadora, al menos, en condiciones basales. Además, la estirpe parental sintetizó hasta 36 FN diferentes en presencia de estrés salino. En estas mismas condiciones, la estirpe mutante *nodD2::* $\Omega$  fue la que menos produjo, ya que solo se identificaron 18 FN distintos. Por otra parte, en presencia de apigenina, el mutante RSP82 fue en esta ocasión el que menos FN sintetizó (20) con respecto a los 29 observados en la estirpe silvestre.



## La síntesis de FN en presencia de apigenina y estrés osmótico está regulada por NodD1 y NodD2, respectivamente

A modo de resumen, en los apartados anteriores se observó que NodD1 y NodD2 eran los principales responsables de la activación de los genes *nod* en presencia de flavonoide apigenina y estrés osmótico, respectivamente. Así también, se decidió estudiar mediante cromatografía en capa fina (TLC) la producción de FN en estas condiciones y en los fondos mutantes RSP82 y *nodD2::Ω*. Por lo tanto, se realizaron ensayos de TLC donde los FN producidos se marcan radioactivamente con  $^{14}\text{C}$  tal y como se describe en la sección de Material y Métodos de esta Tesis Doctoral. Los resultados mostraron que, en presencia de estrés salino y del flavonoide apigenina, se indujo la síntesis de FN en la estirpe silvestre CIAT 899, tal y como ya se había descrito previamente (**Figura 21**) (Estévez *et al.*, 2009). Sin embargo, el mutante *nodD2::Ω* no produjo estas moléculas en presencia de estrés salino, mientras que si lo hizo en presencia de flavonoide apigenina. Por otra parte, la estirpe RSP82 presentó los mismos resultados previamente descritos en Guasch-Vidal *et al.* (2013), donde en presencia de apigenina no se observaron FN, mientras que si se detectaron en presencia de estrés salino. Resumiendo, los resultados de TLC confirman el papel de las proteínas reguladoras NodD1 y NodD2 en la activación de los genes *nod* y, por tanto, en la síntesis de FN. Además, estos resultados de TLC se correlacionan con los resultados de los apartados anteriores en cuanto a los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa y ARNseq.

Ya que se había estudiado también el papel de NodD2 como activador de los genes *nod* bajo estrés osmótico no iónico (manitol) (**Tabla 37**), también se realizaron ensayos de TLC bajo estas condiciones (**Figura 22**). Al igual que ocurrió en presencia de estrés salino, los resultados obtenidos mostraron que NodD2 también regula la síntesis de FN bajo estrés por manitol, ya que no se observaron bandas en el carril correspondiente al mutante *nodD2::Ω* en estas condiciones a diferencia de la estirpe parental.

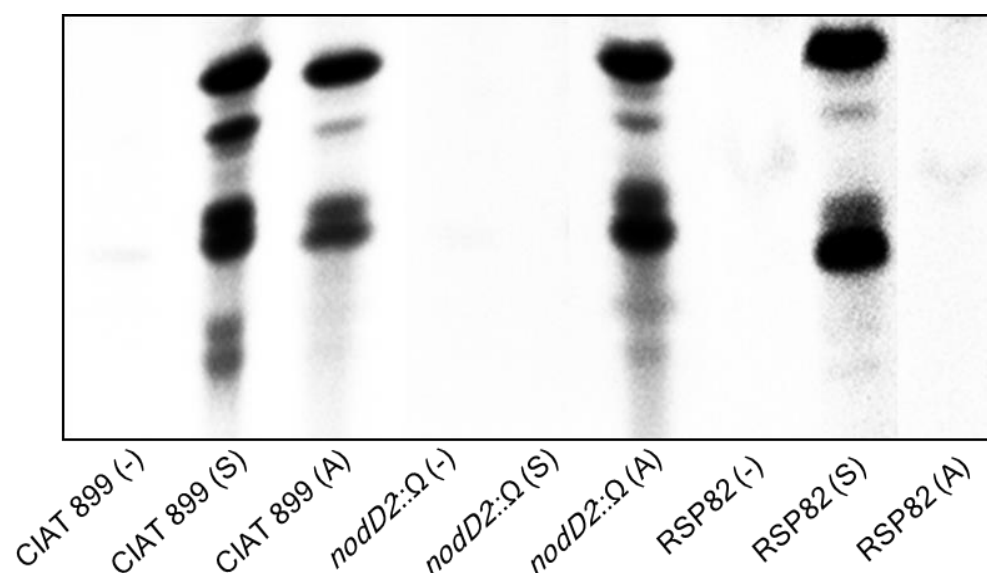


Figura 21 – Ensayos de TLC en la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 y los mutantes RSP82 y *nodD2::Ω* en condiciones control (-), NaCl 300 mM (S) y 3,7  $\mu$ M apigenina (A).

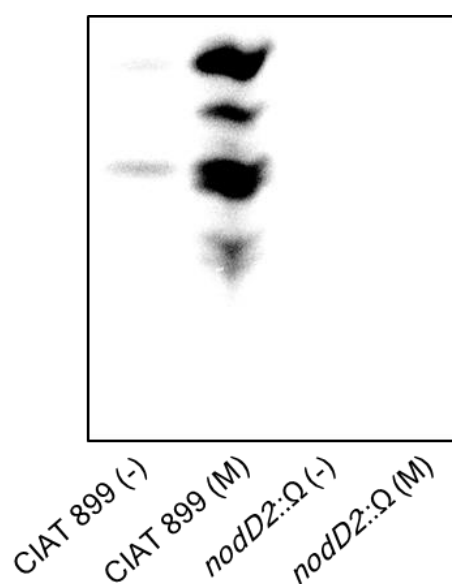


Figura 22 – Ensayos de TLC en la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 y en el mutante *nodD2::Ω* en condiciones control (-) y 400 mM manitol (M).

## Ensayos de nodulación de los mutantes *nodD* de *R. tropici* CIAT 899 con diferentes leguminosas

Tras el estudio de la activación de los genes *nod* y de la síntesis de los FN de CIAT 899 y de los mutantes en los genes *nodD*, se quiso analizar el papel de cada uno de los mutantes en los genes *nodD* en la simbiosis con distintas leguminosas. Para ello, se realizaron ensayos de nodulación en cuatro leguminosas diferentes: *P. vulgaris*, *L.*

*leucocephala*, *L. japonicus* y *L. burttii*. Los resultados mostraron que la estirpe RSP82 (mutante en *nodD1*) no noduló en *L. leucocephala* y *L. japonicus*, mientras que sí lo hizo en las otras leguminosas ensayadas, aunque el número de nódulos (NN) fue significativamente menor en comparación con la estirpe parental (**Tabla 39**). Por el contrario, el resto de las estirpes indujeron nódulos fijadores de nitrógeno en todas las plantas ensayadas. No obstante, la estirpe *nodD2::Ω* produjo un menor NN en *P. vulgaris* y también un menor peso seco de la parte aérea (PSPA) en *L. leucocephala*. Además, las estirpes *nodD3::Ω* y *nodD5::Ω* presentaron un menor NN y PSPA en *L. japonicus*, y las estirpes *nodD4::Ω* y *nodD5::Ω* presentaron un PSPA menor en *L. leucocephala*, con respecto a la estirpe silvestre.

**Tabla 39 – Fenotipo simbiótico de *R. tropici* CIAT 899 y sus derivados afectados en los genes *nodD* en *P. vulgaris*, *L. leucocephala*, *L. japonicus* y *L. burttii*.**

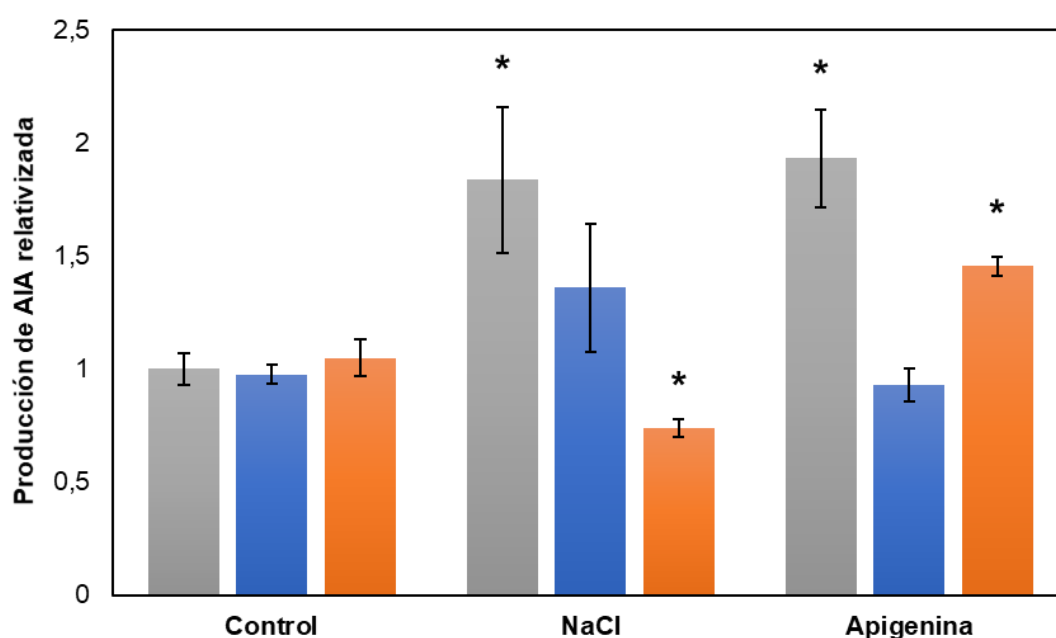
Estirpes	<i>P. vulgaris</i>		<i>L. leucocephala</i>		<i>L. japonicus</i>		<i>L. burttii</i>	
	NN	PSPA	NN	PSPA	NN	PSPA	NN	PSPA
CIAT 899	213 ± 52	1,82 ± 0,64	13 ± 4	0,41 ± 0,03	22 ± 9	0,064 ± 0,03	11 ± 5	0,04 ± 0,02
RSP82	38 ± 11*	1,42 ± 0,35	0 ± 0*	0,09 ± 0,01*	0 ± 0*	0,007 ± 0,004*	5 ± 2*	0,04 ± 0,02
<i>nodD2::Ω</i>	95 ± 38*	1,03 ± 0,27	10 ± 3	0,36 ± 0,04**	30 ± 10	0,039 ± 0,013*	12 ± 5	0,03 ± 0,01
<i>nodD3::Ω</i>	182 ± 25	1,80 ± 0,34	13 ± 3	0,39 ± 0,09	12 ± 4*	0,025 ± 0,014*	9 ± 4	0,04 ± 0,01
<i>nodD4::Ω</i>	190 ± 24	1,84 ± 0,5	14 ± 3	0,37 ± 0,01*	17 ± 6	0,058 ± 0,052	12 ± 5	0,03 ± 0,02
<i>nodD5::Ω</i>	179 ± 16	1,45 ± 0,68	12 ± 4	0,37 ± 0,01*	6 ± 2*	0,021 ± 0,011*	12 ± 2	0,05 ± 0,01
No inóculo	0 ± 0*	0,80 ± 0,25*	0 ± 0*	0,09 ± 0,01*	0 ± 0*	0,008 ± 0,004*	0 ± 0*	0,01 ± 0*

Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos para la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores marcados con \* y \*\* son significativamente diferentes a niveles de  $\alpha = 5\%$  y  $\alpha = 10\%$ , respectivamente.

Todos estos datos muestran la implicación de los cinco genes *nodD* en la interacción simbiótica con leguminosas. Sin embargo, llamó la atención que el mutante en el gen *nodD1*, que no produjo FN en presencia de apigenina, es capaz de seguir nodulando en *P. vulgaris* y *L. burttii*, si bien dejó de nodular en *L. japonicus* y *L. leucocephala*. Por otra parte, los resultados indicaron que *nodD2* podría tener un papel importante en simbiosis, ya que la estirpe *nodD2::Ω*, que no produjo FN en presencia de estrés osmótico, presentó deficiencias en el establecimiento de la simbiosis con dos de las leguminosas ensayadas. El papel de los otros NodD podría ser más específico y moderado según la planta hospedadora, como es el caso de *nodD3* y *nodD5*, que parecen jugar un cierto papel en la nodulación con *L. japonicus*, o el gen *nodD4*, que podría ser relevante en la simbiosis de CIAT 899 con *L. leucocephala*.

## La producción de AIA en *R. tropici* CIAT 899 está regulada por NodD1 y NodD2

En apartados anteriores se demostró que en *R. tropici* CIAT 899, la producción AIA se induce en presencia de apigenina y estrés salino (**Figura 15**). Puesto que los genes de síntesis de AIA (*y4wEF*) están formando un operón bajo la NB4 en CIAT 899, y a raíz de los resultados de ARNseq obtenidos en los mutantes RSP82 y *nodD2::Ω*, se estudió si alguna de las proteínas NodD regula la síntesis de AIA en este rizobio. Así, se realizaron ensayos de producción de AIA en los diferentes mutantes en los genes *nodD*, y en presencia de apigenina y estrés salino. Los resultados mostraron una menor producción de AIA en las estirpes RSP82 y *nodD2::Ω*, tanto en presencia de apigenina como de estrés salino (**Figura 23**). No obstante, el descenso en la producción de AIA hasta niveles similares a la estirpe parental en condiciones control se dio en RSP82 en presencia de apigenina, y en *nodD2::Ω* en presencia de estrés salino. Para el resto de mutantes en los genes *nodD* no se observaron diferencias con respecto a la estirpe silvestre (datos no mostrados).



**Figura 23** – Producción de AIA en *R. tropici* CIAT 899 (barras grises) y los mutantes RSP82 (barras azules) y *nodD2::Ω* (barras rojas). Cuando se requirió, se añadió apigenina (3,7  $\mu$ M) o NaCl (300 mM). La producción de AIA se relativizó con respecto a la producción en las condiciones control de la estirpe parental. Las diferencias en cuanto a la producción de AIA relativa se calculó siguiendo el test no paramétrico de Mann–Whitney. Los \* indican una diferencia significativa al nivel de  $\alpha = 5\%$ .

## Obtención de un doble mutante $\Delta nodD1/\Delta nodD2$ y caracterización fenotípica

A raíz de los resultados que se obtuvieron anteriormente donde NodD1 y NodD2 controlan la expresión de los genes *nod* y la síntesis de los FN en presencia de apigenina y estrés osmótico, respectivamente, y puesto que parecen ser los reguladores determinantes en la interacción simbiótica con leguminosas, se decidió obtener una estirpe mutada en *nodD1* y *nodD2*. Así, se construyó un mutante doble por delección siguiendo el método de PCR solapante descrito en Griffiths y Long (2008), obteniéndose la estirpe  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$ .

Tal y como se había hecho anteriormente, para estudiar la activación de los genes *nod*, se conjugó el plásmido pMP240 en esta estirpe y se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa de ésta tanto en presencia de apigenina como bajo estrés salino (**Figura 24A**). Tal y como se esperaba, la actividad  $\beta$ -galactosidasa del doble mutante en todas las condiciones ensayadas eran similares a las observadas en CIAT 899 en condiciones control, lo que indica que no se activaron los genes *nod* en esta estirpe mutante en ninguna de las condiciones ensayadas. Además, también se comprobó mediante TLC, que el doble mutante  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$  no produjo FN ni en presencia de apigenina ni en presencia de estrés salino (**Figura 24B**).

Teniendo en cuenta que el mutante RSP82 (mutado en el gen *nodD1*) fue capaz de inducir nódulos fijadores de nitrógeno en *P. vulgaris* y *L. burtii*, se decidió comprobar el fenotipo simbiótico del doble mutante  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$  en estas dos plantas (**Tabla 40**). Los resultados mostraron que la estirpe  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$  no noduló en ninguna de las leguminosas ensayadas. Estos resultados confirman que en *R. tropici* CIAT 899, la activación de los genes *nod* y por tanto la producción de los FN tanto en presencia de apigenina como de estrés osmótico, son orquestados por NodD1 y NodD2, siendo ambos reguladores necesarios para establecer simbiosis con leguminosas.

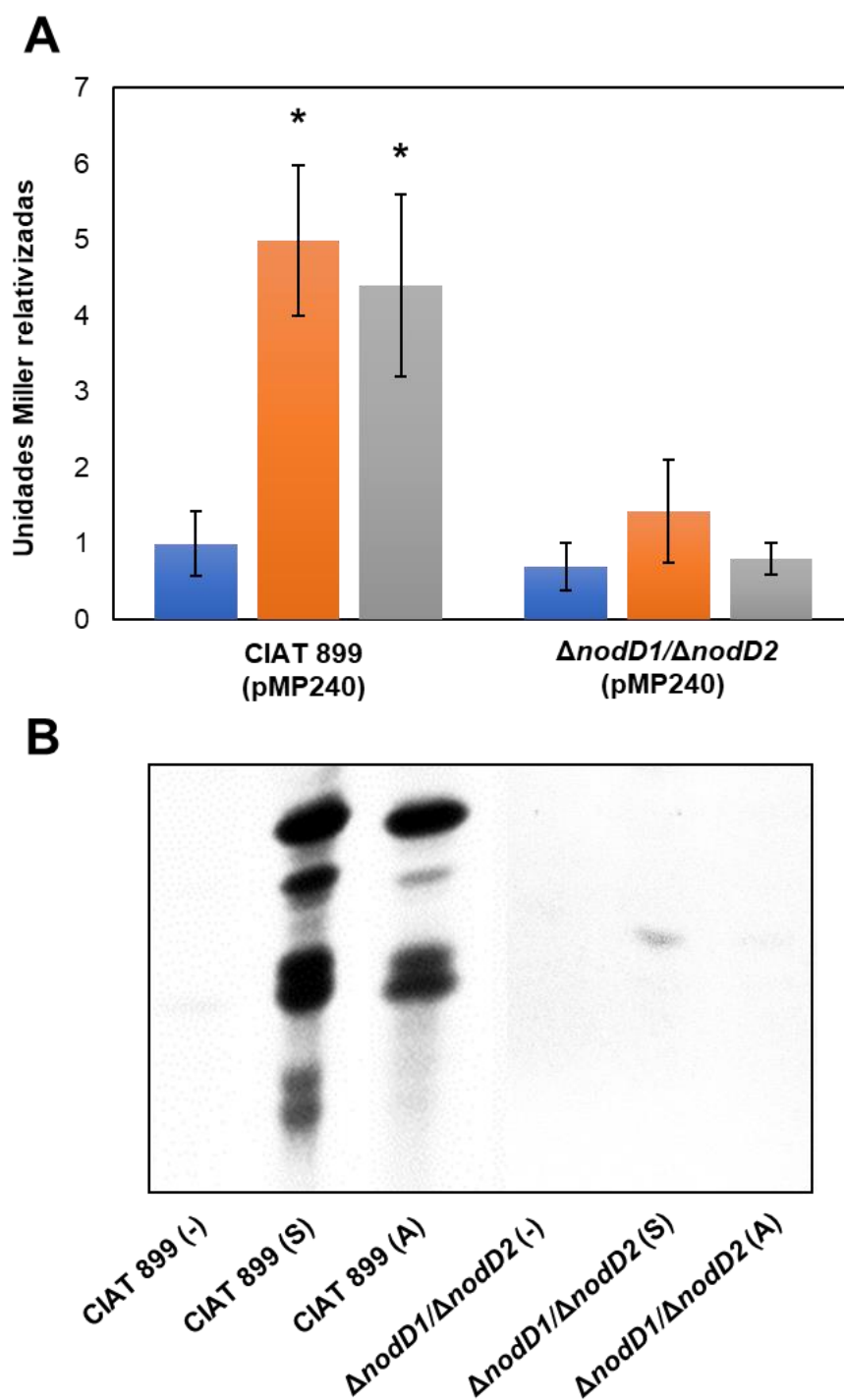


Figura 24 – A. Ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en la estirpe *R. tropici* CIAT 899 (pMP240) y el mutante  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$  (pMP240) en condiciones control (barras azules), NaCl 300 mM (barras rojas) y apigenina 3,7  $\mu$ M (barras grises). Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos en el tratamiento de *R. tropici* CIAT 899 (pMP240) control mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Valores con \* son significativamente diferentes al nivel  $\alpha = 5\%$ . B. Ensayos de TLC en la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 y el mutante  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$  en condiciones control (-), NaCl 300 mM (S) y 3,7  $\mu$ M apigenina (A).

Tabla 40 – Fenotipo simbiótico de *R. tropici* CIAT 899 y el mutante  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$  en *P. vulgaris* y *L. burttii*.

Estirpes	<i>P. vulgaris</i>		<i>L. burttii</i>	
	NN	PSPA (mg)	NN	PSPA (mg)
CIAT 899	225,67 $\pm$ 30,25	1890 $\pm$ 570	14,87 $\pm$ 5,79	46,7 $\pm$ 18,7
$\Delta nodD1/\Delta nodD2$	0 $\pm$ 0*	560 $\pm$ 190*	0 $\pm$ 0*	8,7 $\pm$ 3,8*
No inóculo	0 $\pm$ 0*	500 $\pm$ 40*	0 $\pm$ 0*	4,8 $\pm$ 1,3*

Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos para la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores marcados con \* son significativamente diferentes a niveles de  $\alpha = 5\%$ .

Los FN producidos por *R. tropici* CIAT 899 en presencia de apigenina y estrés salino tienen actividad biológica en *P. vulgaris*.

Para determinar si los FN producidos por *R. tropici* CIAT 899 en diferentes condiciones son activos biológicamente, se estudió la actividad biológica de estas moléculas producidas por las estirpes CIAT 899, RSP82, *nodD2::Ω* y  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$ . Anteriormente, Estévez *et al.* (2009) y Guasch-Vidal *et al.* (2013) demostraron que la aplicación de FN de CIAT 899 inducidos en presencia de apigenina o de estrés salino en las raíces de *P. vulgaris* inducían la formación de primordios nodulares. De hecho, incluso los FN producidos por la bacteria en ausencia de inductores indujeron la formación de algunos primordios.

En los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral, se pudo comprobar de nuevo que la aplicación de FN purificados por la estirpe silvestre en distintas condiciones de cultivo inducía la formación de primordios en judía (**Tabla 41**). En este ensayo, se comprobó que los FN inducidos en presencia de apigenina y de estrés salino por parte de la estirpe silvestre, indujeron un mayor número de primordios que los FN producidos en condiciones control. En cambio, en la estirpe RSP82, el número de primordios observados en raíces inoculadas con FN purificados de cultivos inducidos con apigenina fueron incluso inferiores a los observados en CIAT 899 control, mientras que, en presencia de estrés salino, también hubo un leve descenso de primordios respecto a la estirpe parental, si bien fue la condición donde se indujeron un mayor

número de primordios con los FN purificados de este mutante. Por otro lado, las plantas inoculadas con FN procedentes de la estirpe *nodD2::Ω* presentaron un número de primordios inferior incluso al control de la estirpe silvestre, tanto en condiciones control como bajo estrés salino. No obstante, en presencia de apigenina, el número de primordios fue incluso mayor que los observados en la estirpe parental. Finalmente, en correlación con los datos de nodulación del apartado anterior, los FN purificados del doble mutante  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$  no indujeron la formación de primordios en ninguna de las condiciones ensayadas.

Tabla 41 – Ensayos de actividad biológica de los FN en *P. vulgaris*.

Estirpes	Control	NaCl	Apigenina
CIAT 899	12,5 ± 5,69	<b>23,14 ± 3,48*</b>	<b>35,29 ± 12,88*</b>
RSP82	<b>4,73 ± 3,85*</b>	13,86 ± 5,7	<b>5,3 ± 4,05*</b>
<i>nodD2::Ω</i>	8,33 ± 4,72	9,22 ± 3,46	<b>41,17 ± 5,03*</b>
$\Delta nodD1/\Delta nodD2$	<b>0 ± 0*</b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>0 ± 0*</b>
Sin tratar	<b>0 ± 0*</b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>0 ± 0*</b>

Los FN inoculados se purificaron de *R. tropici* CIAT 899, RSP82, *nodD2::Ω* y  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$  cultivados en ausencia y presencia de apigenina 3,7 μM o NaCl 300 mM. Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos para la estirpe parental en condiciones control mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores marcados con \* y en negrita son significativamente diferentes a niveles de α = 5%.



## Estudio del papel simbiótico de las tres proteínas NodA de *R. tropici* CIAT 899

### Antecedentes

Como ya se mencionó en el apartado de la Introducción de esta Tesis Doctoral, *R. tropici* CIAT 899 tiene tres genes *nodA* en su plásmido simbiótico (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012). En los estudios de ARNseq se observó que los genes *nodA1* y *nodA2* son activados tanto en presencia de apigenina como de estrés osmótico, y además ambos genes están regulados por las NB1 y NB2, respectivamente. A pesar de que *nodA3* carece de NB en su región promotora, este gen presentó un número de transcritos muy elevado en todas las condiciones en las que se realizaron los estudios transcriptómicos, incluido en la condición control (Datos disponibles en NCBI: PRJNA305690). A raíz de estos resultados, y puesto que la presencia de tantas copias del gen *nodA* es algo poco común en la mayoría de los rizobios descritos, se decidió estudiar la función de cada una de las copias de este gen. Para ello, se realizaron mutagénesis dirigidas por delección siguiendo el método de PCR solapante descrito en Griffiths y Long (2008), obteniendo mutantes simples, dobles y triples, de todas las combinaciones posibles ( $\Delta nodA1$ ,  $\Delta nodA2$ ,  $\Delta nodA3$ ,  $\Delta nodA1A2$ ,  $\Delta nodA1A3$ ,  $\Delta nodA2A3$ ,  $\Delta nodA1A2A3$ ). La obtención de estos mutantes se confirmó mediante PCR e hibridación (**Figura 25**).

### Producción de FN en presencia de apigenina y estrés salino en los mutantes de los genes *nodA*

Con el fin de determinar la implicación de cada gen *nodA* en la síntesis de los FN de CIAT 899, se realizaron ensayos de TLC en presencia de apigenina y bajo estrés salino (**Figura 26**). Los resultados mostraron que, en presencia del flavonoide apigenina, todos los mutantes excepto el doble mutante  $\Delta nodA1A3$  y el triple mutante  $\Delta nodA1A2A3$  sintetizaron FN. Sin embargo, en presencia de estrés salino, todas las estirpes producían FN, con la excepción del mutante  $\Delta nodA1A2A3$ . No obstante, en la estirpe mutante  $\Delta nodA1A3$  se observó un menor número de bandas bajo estrés

salino, lo que podría indicar que sigue produciendo FN en menor número, a diferencia de lo que ocurre en presencia de apigenina, donde no se observó ninguna. Por consiguiente, los resultados parecen indicar que, en general, la función de cada gen *nodA* puede ser complementada entre las otras dos copias presentes. Además, los datos parecen sugerir que los genes *nodA1* y *nodA3* parecen ser los más relevantes en la síntesis de FN, mientras que el gen *nodA2* podría ser importante para la biosíntesis de FN solo en condiciones de estrés salino.

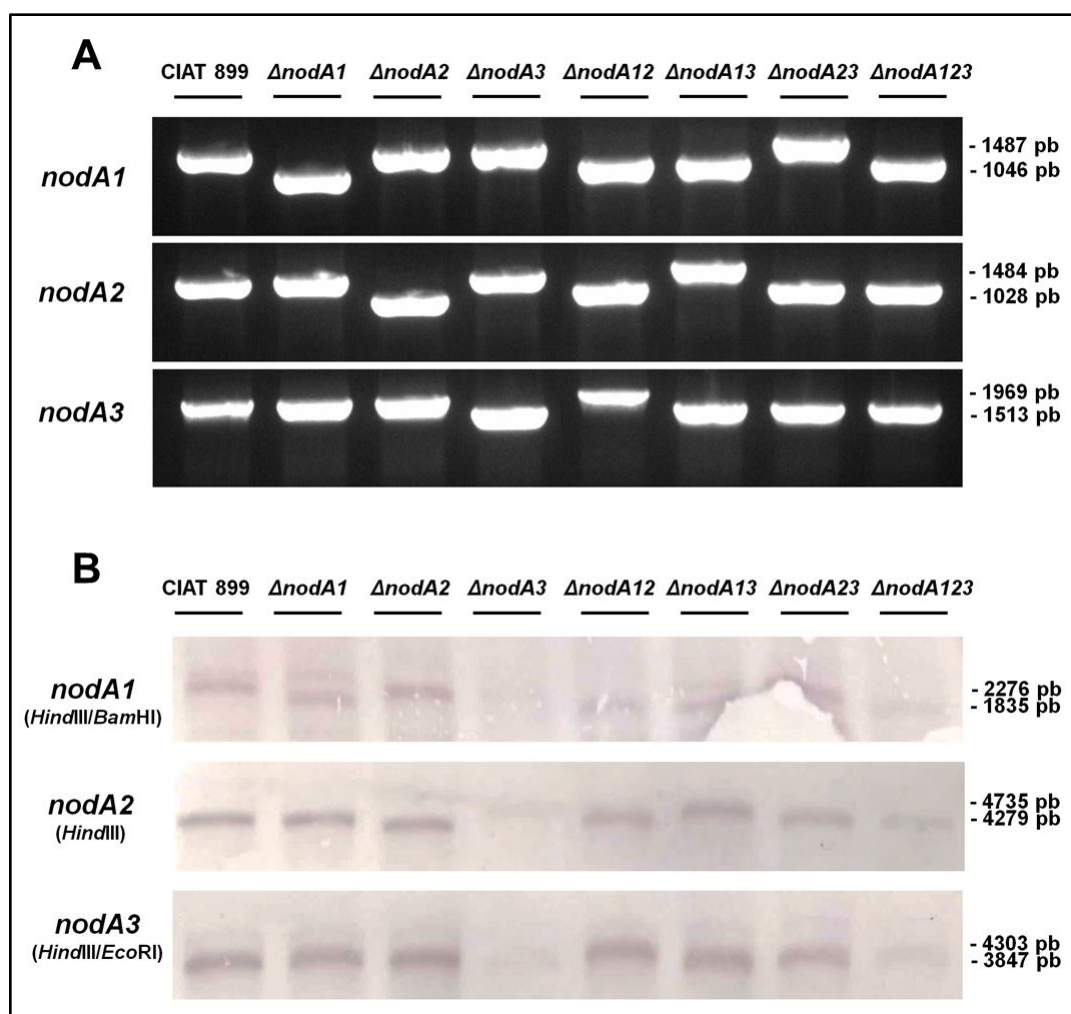
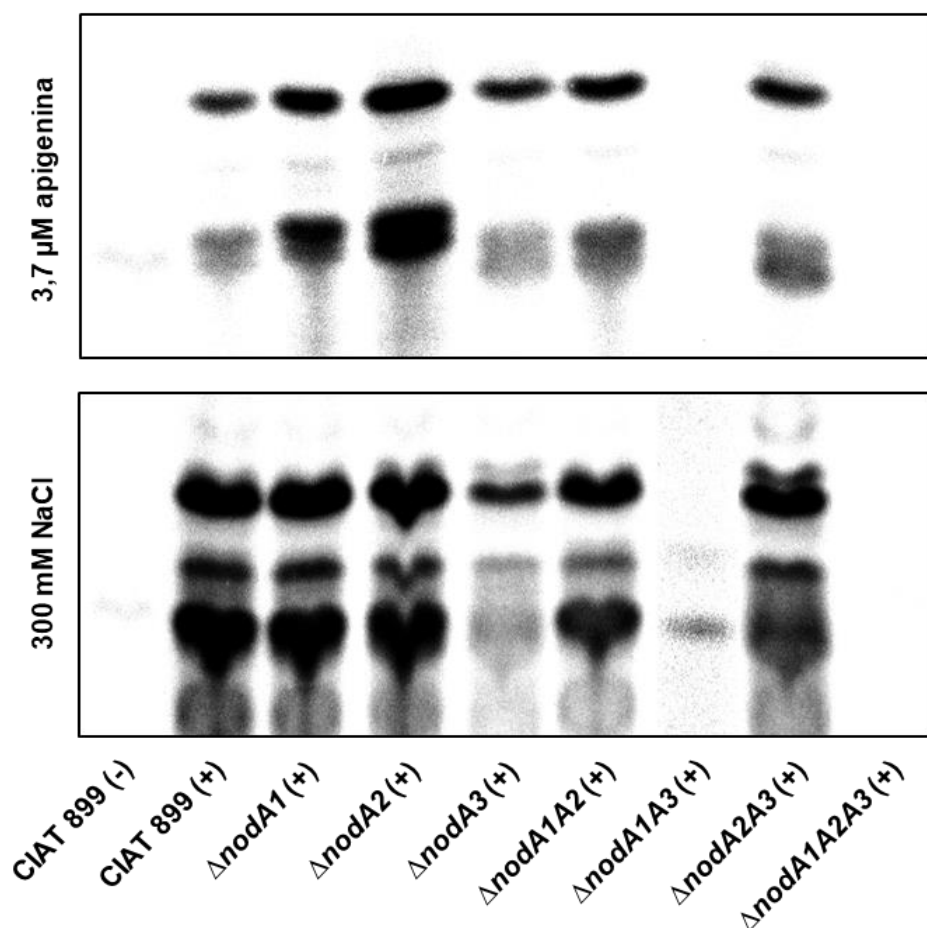


Figura 25 – Comprobación por PCR (A) e hibridación (B) de todos los mutantes por delección obtenidos para los genes *nodA* en *R. tropici* CIAT 899.



**Figura 26 – Ensayos de TLC en la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 y los mutantes en los genes *nodA* en NaCl 300 mM y 3,7 µM apigenina. (-) y (+) indican la ausencia o presencia, respectivamente, de los inductores de los genes *nod* apigenina y NaCl.**

Con el fin de determinar la estructura química de los FN que producen las estirpes que presentaron diferencias en las TLC ( $\Delta nodA1A3$  y  $\Delta nodA1A2A3$ ), se realizaron análisis de los FN producidos por espectrometría de masas tanto en presencia de apigenina como bajo estrés salino (**Tablas 42 y 43**). En presencia del flavonoide apigenina, hasta siete FN diferentes se detectaron en el mutante  $\Delta nodA1A3$  frente a un único factor detectado en el triple mutante  $\Delta nodA1A2A3$ . Aunque el número de FN observados varió en gran medida entre ambas estirpes, en el ensayo de TLC no se observaron bandas en ninguna de estas estirpes. Por tanto, los FN detectados por espectrometría de masas podrían estar produciéndose a baja concentración, no alcanzando el mínimo rango de detección para los ensayos de TLC en esta condición. Por otro lado, bajo estrés salino, se detectaron diez FN (incluidos los siete detectados con apigenina) en el mutante  $\Delta nodA1A3$  frente a un único factor detectado en el triple mutante  $\Delta nodA1A2A3$ , el mismo que el producido por este mutante en presencia de apigenina.

De nuevo, la diferencia en el número de FN sintetizados entre las dos estirpes también varió mucho. No obstante, en el doble mutante  $\Delta nodA1A3$ , las diferencias en el número de FN producidos en presencia de apigenina (7) y estrés salino (10) son pequeñas. En los ensayos de TLC sí se observaron diferencias, ya que en el doble mutante  $\Delta nodA1A3$  se detectó una banda definida en presencia de estrés salino, indicando que la concentración de FN sintetizados podría ser mayor que la observada en presencia de apigenina, y ésta sería por tanto suficiente para superar el umbral de sensibilidad de la técnica de la TLC.

**Tabla 42 – FN producidos por los mutantes  $\Delta nodA1A3$  y  $\Delta nodA1A2A3$  en presencia de apigenina 3,7  $\mu$ M.**

Estructura FN	$\Delta nodA1A3$	$\Delta nodA1A2A3$
IV (C <sub>18:0</sub> )	+	-
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	-
V (C <sub>18:0</sub> )	+	-
V (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	-
V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	+	-
V (C <sub>18:1</sub> )	+	+
V (C <sub>20:0</sub> )	+	-
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>1</b>

(+) indica FN detectados y (-) no detectados. El número romano indica el número de residuos de NAcGlu. C<sub>x:x</sub> indica la longitud del ácido graso y el número de dobles enlaces que presenta. NMe grupo *N*-metilo y S grupo sulfato.

**Tabla 43 – FN producidos por los mutantes  $\Delta nodA1A3$  y  $\Delta nodA1A2A3$  en presencia de NaCl 300 mM.**

Estructura FN	$\Delta nodA1A3$	$\Delta nodA1A2A3$
IV (C <sub>18:0</sub> )*	+	-
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe)*	+	-
V (C <sub>18:0</sub> )*	+	-
V (C <sub>18:0</sub> , NMe)*	+	-
V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)*	+	-
V (C <sub>18:1</sub> )*	+	+
V (C <sub>20:0</sub> )*	+	-

Estructura FN	$\Delta nodA1A3$	$\Delta nodA1A2A3$
V (C <sub>20:1</sub> )	+	-
V (C <sub>20:0</sub> , NMe)	+	-
V (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)	+	-
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>1</b>

(+) indica FN detectados y (-) no detectados. Los FN marcados con \* se han observado también en el mutante  $\Delta nodA1A3$  en presencia de apigenina. El número romano indica el número de residuos de NAcGlu. C<sub>x:x</sub> indica la longitud del ácido graso y el número de dobles enlaces que presenta. NMe grupo N-metilo y S grupo sulfato.

## Caracterización fenotípica de los mutantes en los genes *nodA* en la simbiosis con diferentes leguminosas

Tras observar la producción de los FN por los distintos mutantes en los genes *nodA*, se estudió el fenotipo simbiótico de cada una de las estirpes mutantes en diferentes leguminosas. Tal y como se hizo en el apartado anterior, se realizaron ensayos de nodulación en: *P. vulgaris*, *L. leucocephala*, *L. japonicus* y *L. burttii*. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 44**. Como se puede observar, la mayoría de las estirpes formaron nódulos fijadores de nitrógeno de forma similar a como lo hizo la estirpe silvestre en las cuatro leguminosas ensayadas. No obstante, hubo también notables diferencias. En primer lugar, el triple mutante ( $\Delta nodA1A2A3$ ) no noduló en ninguna de las plantas ensayadas. Además, la estirpe  $\Delta nodA1A3$  noduló en *P. vulgaris* y *L. burttii* de igual forma que la estirpe silvestre, pero no lo hizo en *L. leucocephala* y *L. japonicus*. Por tanto, los fenotipos de nodulación observados se correlacionan con la producción de FN que se observó en los ensayos de TLC, ya que la estirpe  $\Delta nodA1A2A3$ , que no producía FN, tampoco noduló, mientras que la estirpe  $\Delta nodA1A3$ , que solo presentó FN en presencia de estrés salino, noduló en dos de las cuatro leguminosas ensayadas. Finalmente, se observaron otras diferencias como en *L. leucocephala*, donde las plantas inoculadas con las estirpes  $\Delta nodA2$  y  $\Delta nodA3$  presentaron un menor NN que aquellas plantas inoculadas con la estirpe silvestre. Además, en *L. japonicus*, las plantas inoculadas con los mutantes  $\Delta nodA1A2$  y  $\Delta nodA2A3$  también presentaron un menor NN con respecto a las plantas inoculadas con la estirpe parental.

**Tabla 44 – Fenotipo simbiótico de *R. tropici* CIAT 899 y sus derivados afectados en los genes *nodA* en *P. vulgaris*, *L. leucocephala*, *L. japonicus* y *L. burttii*.**

Estirpes	<i>P. vulgaris</i>		<i>L. leucocephala</i>		<i>L. japonicus</i>		<i>L. burttii</i>	
	NN	PSPA (mg)	NN	PSPA (mg)	NN	PSPA (mg)	NN	PSPA (mg)
<b>CIAT 899</b>	194,5 ± 38,9	1060 ± 250	12,6 ± 2,6	260 ± 90	18,1 ± 5,9	31,1 ± 17,7	13,8 ± 7,7	27,3 ± 16,1
<b>Δ<i>nodA1</i></b>	187,6 ± 37,5	1090 ± 90	11,6 ± 4,1	280 ± 110	16,4 ± 7,9	39 ± 9,5	9,4 ± 4,3	20,9 ± 12,1
<b>Δ<i>nodA2</i></b>	185,3 ± 30	940 ± 170	<b>10,1 ± 4,5*</b>	290 ± 70	16,4 ± 5,3	25,8 ± 14,2	11,1 ± 6,1	18,9 ± 8,7
<b>Δ<i>nodA3</i></b>	185,4 ± 38	1350 ± 600	<b>8,6 ± 3,7*</b>	220 ± 110	16 ± 4,6	20,5 ± 10,2	13 ± 7,8	28,1 ± 16
<b>Δ<i>nodA1A2</i></b>	168,4 ± 44,8	950 ± 220	10,7 ± 5,1	310 ± 90	<b>11,6 ± 6,6*</b>	33,4 ± 12,4	12,2 ± 4,9	34,8 ± 19,5
<b>Δ<i>nodA1A3</i></b>	187,1 ± 54,7	<b>720 ± 170*</b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>90 ± 30*</b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>7,7 ± 2,2*</b>	9,1 ± 6,1	17,1 ± 10,3
<b>Δ<i>nodA2A3</i></b>	195,6 ± 45,6	1110 ± 70	9,8 ± 4,3	250 ± 90	<b>10,4 ± 2,8*</b>	27,6 ± 11,6	12,8 ± 6,4	31,9 ± 16,6
<b>Δ<i>nodA1A2A3</i></b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>590 ± 150*</b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>130 ± 40*</b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>6,4 ± 1*</b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>10,8 ± 8,6*</b>
<b>No inóculo</b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>490 ± 130*</b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>130 ± 40*</b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>3,6 ± 0,8*</b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>6,9 ± 1,5*</b>

Estas leguminosas se inocularon con *R. tropici* CIAT 899 y los mutantes en los genes *nodA*. Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos para la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores marcados con \* son significativamente diferentes a niveles de  $\alpha = 5\%$ .

Quizás uno de los resultados más sorprendente de este estudio fue que el mutante *ΔnodA1A2*, que solo porta funcional el gen *nodA3*, presentó el mismo fenotipo simbiótico que la estirpe parental, con la única diferencia de que indujo un menor NN en *L. japonicus*.

## Actividad biológica de los FN producidos por *R. tropici* CIAT 899 y los mutantes *ΔnodA1A3* y *ΔnodA1A2A3* en *P. vulgaris*

Ya que anteriormente se habían observado diferencias en los FN producidos, y en los fenotipos simbióticos en las estirpes *ΔnodA1A3* y *ΔnodA1A2A3*, se realizaron ensayos de actividad biológica en *P. vulgaris*, planta en la que el doble mutante *ΔnodA1A3* noduló pero el triple mutante *ΔnodA1A2A3* no lo hizo. Por tanto, tras la purificación de los FN en condiciones control, en presencia de apigenina y en presencia de estrés salino, y tras su aplicación en plántulas de judía, se observó que el triple mutante *ΔnodA1A2A3* no indujo la formación de primordios en ninguna de las condiciones (Tabla 45). Sin embargo, la estirpe *ΔnodA1A3* indujo primordios en todas las

condiciones, siendo el número de primordios en las condiciones control y bajo estrés salino similares a los detectados en la estirpe silvestre. En cambio, en presencia de apigenina, se observó un menor número de primordios en el mutante  $\Delta nodA1A3$  que en la estirpe parental en la misma condición. El mayor número de primordios observados en condiciones de estrés salino para la estirpe  $\Delta nodA1A3$  podría correlacionarse con la mayor capacidad para sintetizar FN en estas condiciones (**Figura 26**) (**Tablas 42 y 43**). Este hecho también podría explicar que el mutante  $\Delta nodA1A3$  indujera nódulos efectivos en *P. vulgaris* y *L. burttii* (**Tabla 44**).

**Tabla 45 – Ensayos de actividad biológica de los FN aplicados en raíces de *P. vulgaris*.**

Estirpes	Control	NaCl	Apigenina
<b>CIAT 899</b>	15.8 ± 2.9	<b>25.3 ± 3.2*</b>	<b>32.6 ± 6.2*</b>
<b><math>\Delta nodA1A3</math></b>	13.3 ± 4.7	<b>24.3 ± 2.9*</b>	20.9 ± 5.1
<b><math>\Delta nodA1A2A3</math></b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>0 ± 0*</b>
<b>Sin tratar</b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>0 ± 0*</b>

Los FN inoculados se purificaron de *R. tropici* CIAT 899,  $\Delta nodA13$  y  $\Delta nodA1A2A3$  cultivados en ausencia y presencia de apigenina 3,7  $\mu$ M o NaCl 300 mM. Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos para la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 control mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores marcados con \* y en negrita son significativamente diferentes a niveles de  $\alpha = 5\%$ .





## Caracterización de otros genes implicados en la síntesis de FN bajo estrés osmótico

NrcR, regulador transcripcional de la familia ArsR.

### *Antecedentes*

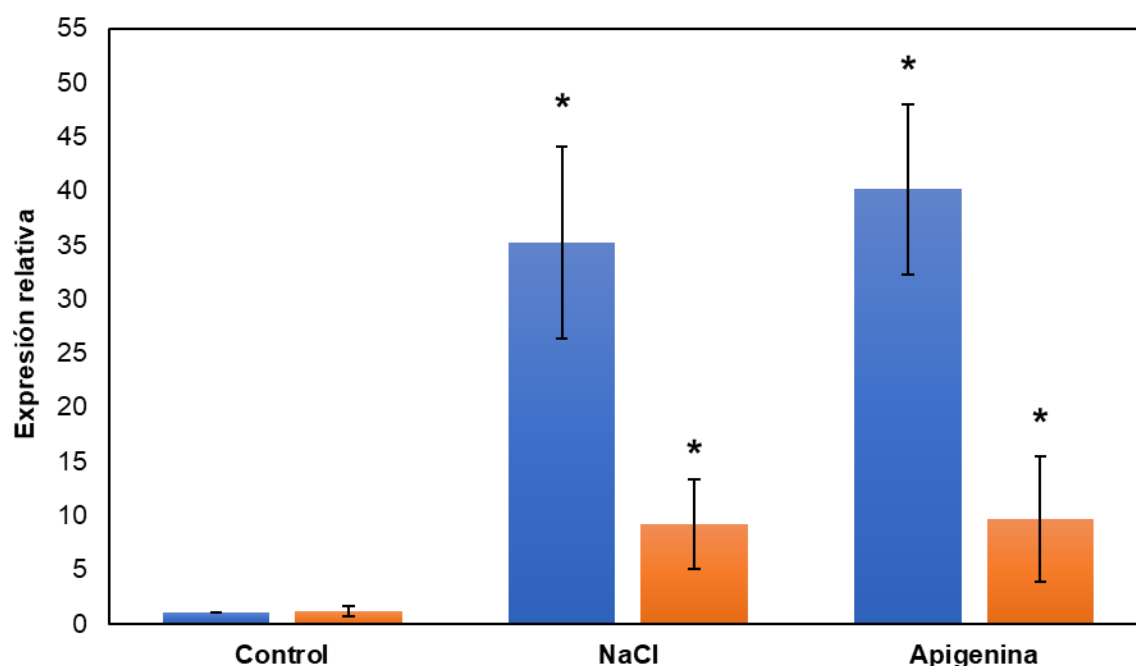
En los procariotas, la familia de reguladores transcripcionales ArsR está ampliamente distribuida en muchas bacterias, incluyendo varias especies de rizobios. Un miembro bien caracterizado de esta familia es la proteína NoIR, descrita originalmente como represor general de *nodD1* y del operón *nodABC* en *S. meliloti* (Kondorosi *et al.*, 1989; Kondorosi *et al.*, 1991; Cren *et al.*, 1995).

En la secuenciación del genoma de *R. tropici* CIAT 899, se halló un gen *noIR* (RTCIAT899\_CH13035) localizado en el cromosoma bacteriano y otro gen (RTCIAT899\_PC05430), situado en el plásmido pRtrCIAT899c, que codifica una proteína no descrita que comparte una identidad del 46% (65% de aminoácidos positivos) con la proteína NoIR de CIAT 899, siendo la homología mayor en el dominio hipotético de unión a ADN (64% de identidad y 72% de aminoácidos positivos). Así, en la presente Tesis Doctoral se estudió el papel de este nuevo gen similar *noIR*, no descrito previamente y al que se denominó *nrcR* (noIR del plásmido c). Para estudiar la función de este gen, se realizó mutagénesis dirigida por inserción del interposón  $\Omega$  en la secuencia del gen *nrcR* siguiendo la misma metodología que se siguió con los otros mutantes por inserción del interposón  $\Omega$  (ver Material y Métodos).

### *Ensayos de qRT-PCR en R. tropici CIAT 899 y en el mutante nrcR:: $\Omega$ en presencia de apigenina y estrés osmótico*

Para determinar si la mutación del gen *nrcR* altera la expresión de los genes *nod*, se realizaron ensayos de qRT-PCR del gen *nodC* en presencia de apigenina y de estrés salino. Los experimentos de qRT-PCR mostraron que la expresión relativa del gen

*nodC* es significativamente menor en presencia tanto de apigenina como de estrés salino en el mutante *nrcR::Ω* en comparación con la estirpe parental (**Figura 27**), disminuyendo de 35 a 9 veces en presencia de estrés salino y aproximadamente de 40 a 9,5 en presencia de apigenina. Estos datos sugieren que NrcR podría actuar como un activador de los genes *nod* en CIAT 899.



**Figura 27** – Ensayos de qRT-PCR de la expresión del gen *nodC* en *R. tropici* CIAT 899 (barras azules) y en el mutante *nrcR::Ω* (barras rojas) en condiciones control (TY), NaCl (TY + 300 mM NaCl) y apigenina (TY + 3,7  $\mu$ M). Los datos de expresión se compararon individualmente con la expresión del control de la estirpe parental sin inductores utilizando test no paramétrico de Mann-Whitney. Los \* indican una diferencia significativa a nivel  $\alpha = 5\%$ .

### *Análisis de los FN producidos en R. tropici CIAT 899 y en el mutante nrcR::Ω en presencia de apigenina y estrés salino*

Para determinar si la mutación en el gen *nrcR* afecta a la producción y decoración de los FN, se determinó la estructura química de estos factores mediante espectrometría de masas en condiciones control, con apigenina y con estrés salino (**Tabla 46**) (**Anexos 1-3**). Los resultados mostraron que, en condiciones control, CIAT 899 y *nrcR::Ω* sintetizaron 11 y 15 FN diferentes, respectivamente. De estos FN, ocho se produjeron por ambas estirpes, tres se produjeron exclusivamente por la estirpe parental y siete solo por la mutante. Por otro lado, en presencia de apigenina, ambas

estirpes sintetizaron 29 FN, 23 de los cuales fueron comunes en ambas estirpes, y seis fueron exclusivos de cada una. Finalmente, en presencia de estrés salino, el mutante *nrcR::Ω* sintetizó hasta 47 FN frente a los 36 producidos por la cepa parental. Aunque esta metodología no permite determinar la concentración de los FN producidos, sí se observó que el mutante *nrcR::Ω* produce un mayor número de FN diferentes, lo que indica que NrcR podría actuar como un represor de la síntesis de FN con diferentes decoraciones, especialmente bajo estrés salino. La estructura molecular de cada uno de los FN producidos por ambas estirpes se muestran en los **Anexos 1-3**.

**Tabla 46 – Número total de FN producidos por la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 y el mutante *nrcR::Ω* en condiciones control (B<sup>-</sup>), NaCl 300 mM y apigenina 3,7 μM.**

Condición	CIAT 899	<i>nrcR::Ω</i>
Control	11	15
NaCl	36	47
Apigenina	29	29

En cuanto a las decoraciones, se observó que *nrcR::Ω* sintetiza FN con más decoraciones de grupos sulfatos que los producidos por la estirpe silvestre. Así, en condiciones control, CIAT 899 sintetizó un FN con sulfato frente a los cuatro producidos por el mutante *nrcR::Ω*. En presencia de apigenina ocurrió algo parecido ya que CIAT 899 sintetizó tres FN sulfatados frente a los cinco sintetizados por el mutante. Finalmente, en presencia de estrés salino fue donde se produjeron más FN sulfatados. La estirpe silvestre indujo la producción de ocho factores sulfatados frente a los nueve sintetizados por la estirpe mutante. Por otra parte, en relación con los ácidos grasos de 20 átomos de carbono, la estirpe parental sintetizó solo cuatro de estos factores, uno en presencia de apigenina y tres en condiciones de estrés salino, mientras que la estirpe mutante sintetizó 15 FN con 20 átomos de carbono en su ácido graso, cuatro en presencia de apigenina y 13 en presencia de estrés salino. Todas las estructuras de los FN detectados se muestran en los **Anexos 1-3**.

### *Ensayos de nodulación de R. tropici CIAT 899 y nrcR::Ω en P. vulgaris y L. leucocephala.*

A continuación, se estudió si la mutación en el gen *nrcR* tiene algún efecto en la simbiosis de este rizobio con *P. vulgaris* y *L. leucocephala*. Los resultados, que se muestran en la **Tabla 47**, indican que tanto en *P. vulgaris* como en *L. leucocephala*, el mutante *nrcR::Ω* indujo significativamente menos nódulos que los nódulos inducidos por la estirpe parental. Además, la disminución de la nodulación en el mutante también se correlacionó con un menor PSPA en comparación con la estirpe silvestre, siendo esta disminución significativa en plantas de leucena, pero no en las de judía. Finalmente, también se utilizaron en este ensayo de nodulación dos estirpes complementadas: *nrcR::Ω* (pMUS1333), que porta el gen silvestre clonado en pBBR1-MCS-5 y *nrcR::Ω::pMUS1353* (plásmido integrado en el pRtrCIAT899c). Solo la estirpe *nrcR::Ω* (pMUS1353) restauró el fenotipo simbiótico de la estirpe silvestre. Posiblemente, la estirpe *nrcR::Ω* (pMUS1333) no complementó el fenotipo simbiótico de la estirpe silvestre porque el gen *nrcR* está presente en una dosis génica superior a la de la estirpe parental y a la de la estirpe *nrcR::Ω::pMUS1353*, que solamente porta una copia del gen silvestre.

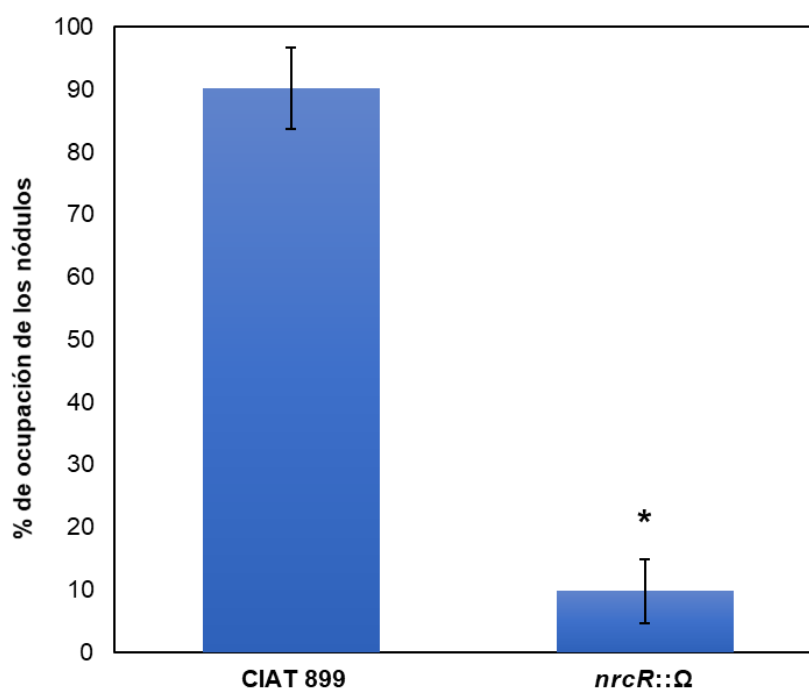
**Tabla 47 – Fenotipo simbiótico de *R. tropici* CIAT 899, el mutante *nrcR::Ω*, *nrcR::Ω* (pMUS1333) y *nrcR::Ω::pMUS1353* en *P. vulgaris* y *L. leucocephala*.**

Estirpes	<i>P. vulgaris</i>		<i>L. leucocephala</i>	
	NN	PSPA (g)	NN	PSPA (g)
<b>CIAT 899</b>	251,3 ± 30,25	1,58 ± 0,21	17,5 ± 3,1	0,49 ± 0,05
<b><i>nrcR::Ω</i></b>	<b>160,2 ± 28,38*</b>	1,18 ± 0,37	<b>10,3 ± 3,73*</b>	<b>0,39 ± 0,03*</b>
<b><i>nrcR::Ω</i> (pMUS1333)</b>	<b>158,5 ± 36,13*</b>	<b>1,10 ± 0,21*</b>	<b>10,1 ± 3,89*</b>	<b>0,36 ± 0,05*</b>
<b><i>nrcR::Ω::pMUS1353</i></b>	220,6 ± 44,37	1,41 ± 0,33	16,7 ± 3,5	0,48 ± 0,03
<b>No inóculo</b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>0,70 ± 0,18*</b>	<b>0 ± 0*</b>	<b>0,23 ± 0,05*</b>

Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos para la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores marcados con \* y en negrita son significativamente diferentes a niveles de  $\alpha = 5\%$ .

### *Ensayos de competitividad en *P. vulgaris* muestran que el mutante *nrcR::Ω* es menos competitivo que la estirpe silvestre*

Además de los ensayos de nodulación, también se realizaron ensayos de competitividad en los que se comprobó que la estirpe mutante era menos competitiva para nodular *P. vulgaris* que la estirpe silvestre cuando se coinocularon en proporción 1:1. Así, los resultados mostraron que, 45 días después de la coinoculación, tan solo el 10% del total de los nódulos estaban ocupados por la estirpe *nrcR::Ω* (**Figura 28**). Estos resultados indicaron que el mutante *nrcR::Ω* es mucho menos competitivo que la estirpe parental, lo que podría explicar el fenotipo simbiótico observado en los ensayos de nodulación del apartado anterior.



**Figura 28 – Ensayos de competitividad entre *R. tropici* CIAT 899 y el mutante *nrcR::Ω* en *P. vulgaris*. Los porcentajes de ocupación de nódulos se midieron para ambas cepas tras 45 días de coinoculación. Los datos obtenidos para la estirpe *nrcR::Ω* se compararon individualmente con los obtenidos en la estirpe *R. tropici* CIAT 899 mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. El valor marcado por asterisco \* es significativamente diferente a nivel  $\alpha = 5\%$**

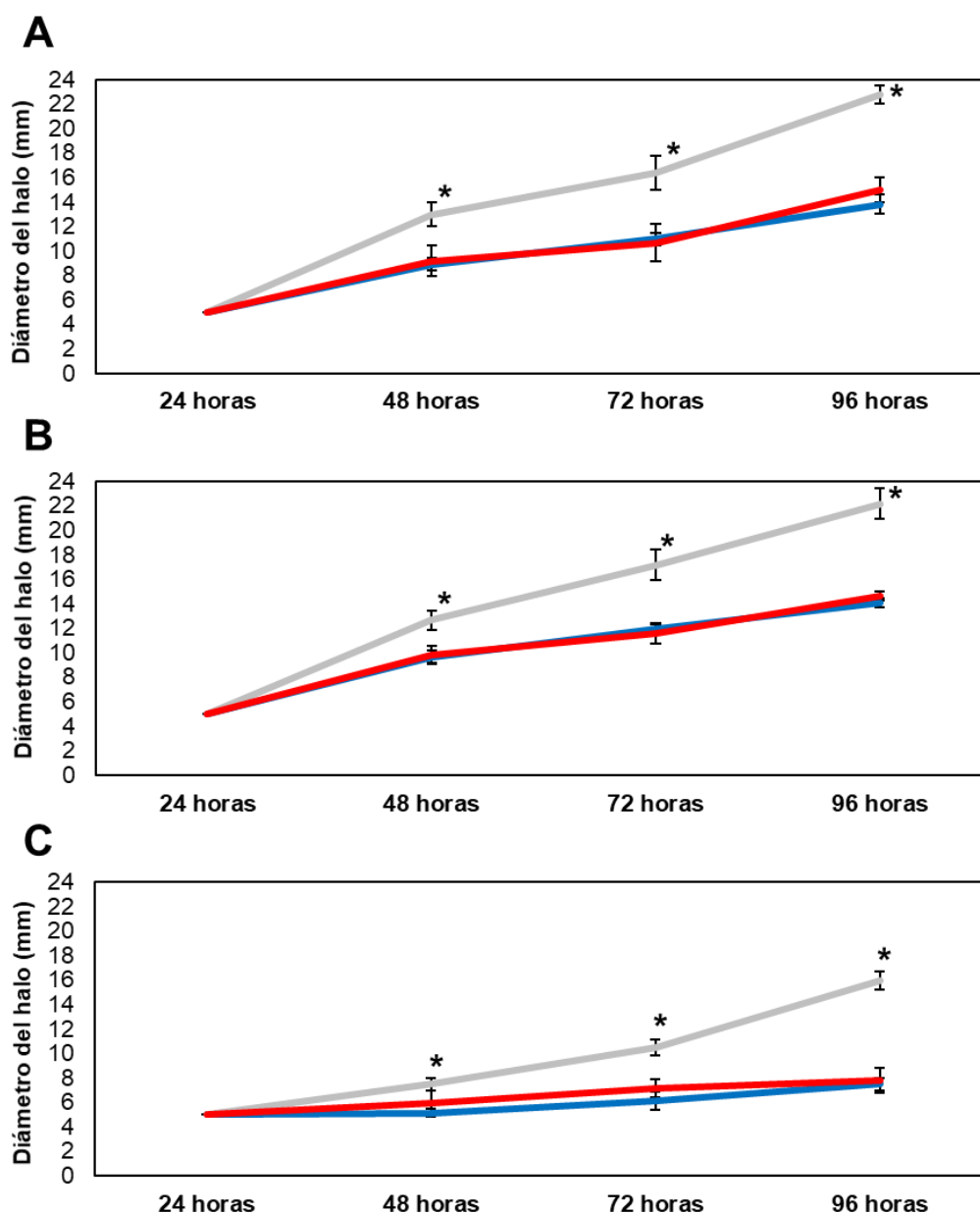
### *NrcR regula otros fenotipos bacterianos que son relevantes en la simbiosis rizobio-leguminosa*

Ya que NrcR es un regulador transcripcional, otros fenotipos podrían estar regulados por esta proteína. Por ello, se llevaron a cabo ensayos de movilidad, producción de polisacáridos, producción de acil-homoserinlactonas (AHL) y formación de biofilms. De todos los ensayos realizados, solo se observaron diferencias fenotípicas en los ensayos de movilidad en superficie y en la producción de EPS.

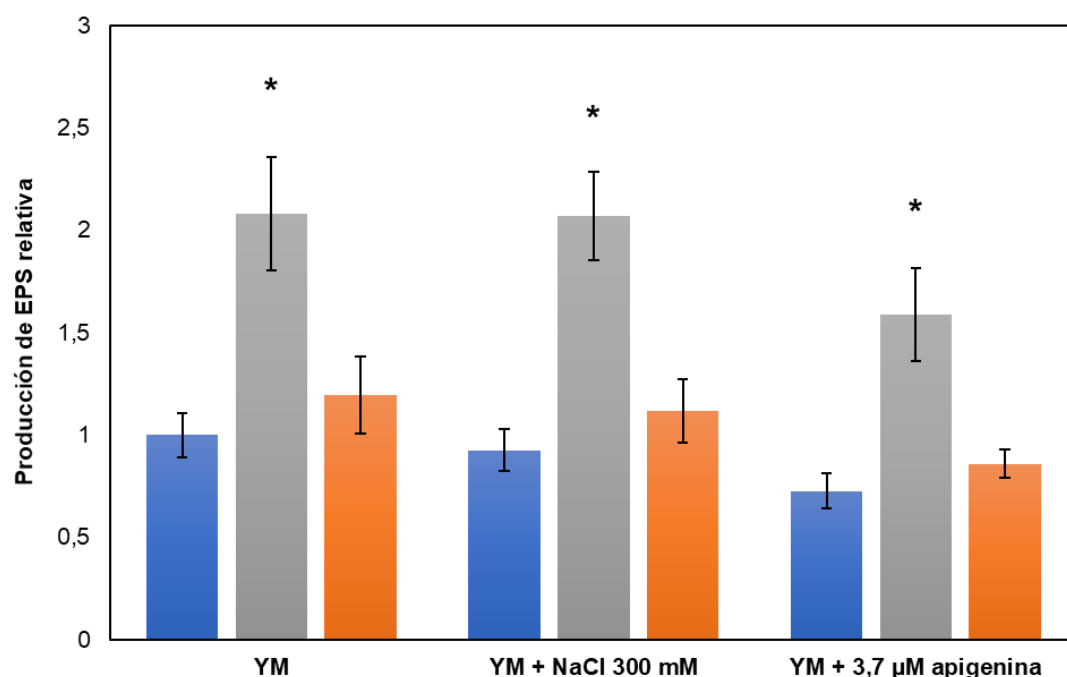
Aunque los experimentos de movilidad en superficie se llevaron a cabo en los medios TY y B<sup>-</sup>, solo se observaron diferencias significativas cuando se utilizó el medio TY, donde el mutante *nrcR::Ω* fue aproximadamente 40% más móvil que la estirpe silvestre en condiciones control y en presencia de apigenina (**Figura 29**). Por otro lado, la presencia de estrés salino en el medio dio lugar a una reducción drástica de la movilidad en todas las estirpes ensayadas. Mientras que la cepa silvestre fue prácticamente inmóvil, el mutante *nrcR::Ω* presentó una movilidad incluso mayor que la de la estirpe parental en condiciones control y en presencia de apigenina. La estirpe complementada *nrcR::Ω* (pMUS1333) se comportó de manera similar a la estirpe silvestre.

La producción de EPS se cuantificó siguiendo el método antrona (Tomlinson *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos, que se muestran en la **Figura 30**, indican que la estirpe *nrcR::Ω* produjo una cantidad significativamente mayor de EPS que la estirpe silvestre en todas las condiciones ensayadas (control, estrés salino y apigenina). Además, el mutante complementado *nrcR::Ω* (pMUS1333) se comportó como la estirpe silvestre en todas las condiciones. Tal y como ocurre en otros rizobios como *S. fredii* HH103 (Acosta-Jurado *et al.*, 2016b), la presencia del flavonoide inductor redujo ligeramente la cantidad de EPS que se produjo en CIAT 899, *nrcR::Ω* y *nrcR::Ω* (pMUS1333).

También se estudió la composición del EPS que producen estas estirpes mediante análisis del monosacárido y resonancia magnética nuclear (RMN). La composición del azúcar y los espectros de RMN obtenidos fueron prácticamente idénticos en CIAT 899 y el mutante *nrcR::Ω* (datos no mostrados). Por lo tanto, los resultados sugieren que el regulador transcripcional NrcR inhibe, directa o indirectamente, la producción de EPS, pero sin afectar a su estructura química.



**Figura 29** – Ensayos de movilidad en superficie de *R. tropici* CIAT 899 (línea azul), del mutante *nrcR::Ω* (línea gris) y del mutante complementado *nrcR::Ω* (pMUS1333) (línea roja) en condiciones control (A), presencia de apigenina 3,7  $\mu$ M (B) y NaCl 300 mM (C). Se cuantificó el diámetro del halo formado. Los valores obtenidos en las estirpes *nrcR::Ω* y *nrcR::Ω* (pMUS1333) se compararon individualmente con la estirpe parental en cada condición mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores marcados por \* son significativamente diferentes ( $\alpha = 5\%$ ).



**Figura 30 – Producción de EPS de *R. tropici* CIAT 899 (barras azules), *nrcR::Ω* (barras grises) y *nrcR::Ω* (pMUS1333) (barras rojas).** Los valores se relativizaron a aquellos valores obtenidos en *R. tropici* CIAT 899 en condiciones control. Los valores obtenidos en las estirpes *nrcR::Ω* y *nrcR::Ω* (pMUS1333) se compararon individualmente con la estirpe parental en cada condición mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores marcados por \* son significativamente diferentes ( $\alpha = 5\%$ ).

## AraC, un regulador transcripcional de la familia AraC próximo a *nodD2* en el genoma de *R. tropici* CIAT 899

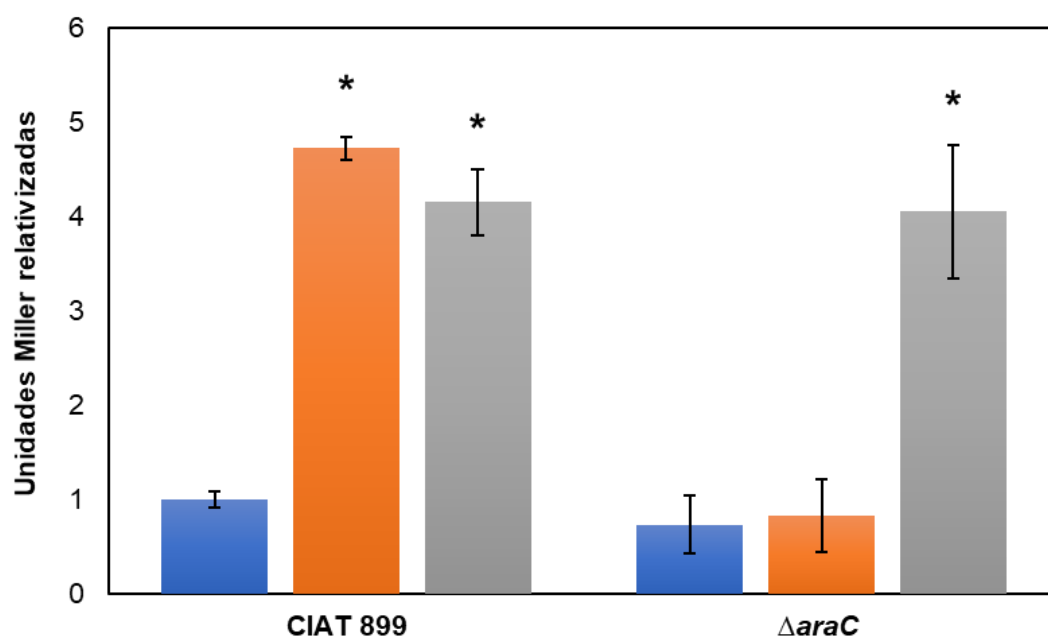
### Antecedentes

Tras la secuenciación del genoma de CIAT 899 se observó que en el plásmido simbiótico y a 200 pb aguas abajo del gen *nodD2*, se localiza un gen que codifica para un regulador transcripcional de la familia AraC (gen *araC*, *RTCIAT899\_PB01075*). Debido a su localización en el genoma, se consideró relevante estudiar la función que podría desempeñar. Así, se llevó a cabo su mutagénesis dirigida por delección en fase siguiendo el método de Griffiths y Long (2008), obteniéndose la estirpe mutada  $\Delta araC$  (ver Material y Métodos).

Con el fin de estudiar si esta proteína regula la activación de los genes de nodulación, se conjugó el plásmido pMP240 a la estirpe  $\Delta araC$ , y a continuación, se realizaron



ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en condiciones control, en presencia de apigenina y bajo estrés salino (**Figura 31**). Los niveles de actividad que se observaron fueron similares para ambas estirpes tanto en condiciones control y como en presencia de apigenina. No obstante, en condiciones de estrés salino, los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa observados en el mutante  $\Delta araC$  fueron significativamente menores en comparación con la estirpe silvestre, siendo estos niveles similares a los observados en las condiciones control. Este resultado podría sugerir que AraC, al igual que hace NodD2, sea esencial en la activación de los genes *nod* y por tanto en la síntesis de FN en condiciones de estrés salino.



**Figura 31** – Ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en las estirpes *R. tropici* CIAT 899 (pMP240) y  $\Delta araC$  (pMP240) en condiciones control (barras azules), NaCl 300 mM (barras rojas) y apigenina 3,7  $\mu$ M (barras grises). Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos en el tratamiento CIAT 899 (pMP240) control mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Valores con \* son significativamente diferentes al nivel  $\alpha = 5\%$ .

*Los estudios de ARNseq muestran que AraC es esencial para la activación de los genes nod en presencia de estrés salino.*

Para determinar si efectivamente AraC podría actuar en la activación de los genes *nod* en presencia de estrés salino se realizó un estudio de ARNseq del mutante  $\Delta araC$  en condiciones control, en presencia de apigenina y en presencia de 300 mM de NaCl,

siguiendo la misma metodología descrita anteriormente. Todos los resultados en número de transcritos se compararon uno a uno con las condiciones control de la estirpe parental sin inducir. En este análisis el umbral para considerar los genes diferencialmente expresados fue de  $\pm 4$  veces de inducción, tal y como se describe en Material y Métodos.

Los datos obtenidos en estos nuevos estudios transcriptómicos mostraron que, en el mutante  $\Delta araC$ , en condiciones de estrés salino ninguno de los 14 genes *nod* que se activaron en la estirpe silvestre lo hicieron en la estirpe mutante, confirmando el papel de AraC en la activación de los genes *nod* bajo estrés salino (**Tabla 48**). De hecho, los genes *y4wE* e *y4wF* relacionados con la síntesis de AIA y bajo regulación de la NB4 tampoco se activaron diferencialmente en la estirpe  $\Delta araC$  en estas mismas condiciones, ni los genes regulados por la NB5 (*RTCIAT899\_PB01550* y *RTCIAT899\_PB01545*). Cabe resaltar que la expresión del gen *nodD2*, que como se ha descrito anteriormente es el regulador de los genes *nod* en presencia de estrés salino, pasó de ser 3,01 en la estirpe silvestre a -1,28 en el mutante. Este dato sugiere que AraC podría estar regulando la expresión de *nodD2*, actuando aguas arriba en la cascada regulatoria de la activación de los genes *nod* en presencia de estrés salino.

**Tabla 48 – Expresión diferencial de todos los genes *nod* o de los genes regulados por NB y diferencialmente expresados en *R. tropici* CIAT 899 y el mutante  $\Delta araC$  en presencia de 300 mM de NaCl con respecto al control de la estirpe parental.**

Número de acceso NCBI/ID	Gen	NB	Inducción en CIAT 899	Inducción en $\Delta araC$
RTCIAT899_PB01295	<i>nodD1</i>		1,04	1,15
RTCIAT899_PB01070	<i>nodD2</i>	NB9	3,01	-1,28
RTCIAT899_PB00640	<i>nodD3</i>		2,1	-1,38
RTCIAT899_PB01560	<i>nodD4</i>		1,16	-1,13
RTCIAT899_PB00560	<i>nodD5</i>		-1,09	-1,17
RTCIAT899_PB01300	<i>nodA1</i>	NB1	13,66	-1,43
RTCIAT899_PB01305	<i>nodB</i>	NB1	19,01	1,56
RTCIAT899_PB01310	<i>nodC</i>	NB1	12	1,15
RTCIAT899_PB01315	<i>nodS</i>	NB1	12,89	1,13
RTCIAT899_PB01320	<i>nodU</i>	NB1	10,18	1,45

Número de acceso NCBI/ID	Gen	NB	Inducción en CIAT 899	Inducción en $\Delta araC$
RTCIAT899_PB01325	<i>nodI</i>	NB1	<b>12,48</b>	1,01
RTCIAT899_PB01330	<i>nodJ</i>	NB1	<b>10,15</b>	-1,01
RTCIAT899_PB01340	<i>nodH</i>	NB1	<b>7,6</b>	-1,13
RTCIAT899_PB01345	<i>nodP</i>	NB1	<b>6,08</b>	-1,30
RTCIAT899_PB01350	<i>nodQ</i>	NB1	<b>6,39</b>	-1,44
RTCIAT899_PB01095	<i>nodA2</i>	NB2	<b>9,81</b>	-1,42
RTCIAT899_PB01115	<i>nodF</i>	NB2	<b>13,43</b>	1,20
RTCIAT899_PB01120	<i>nodE</i>	NB2	<b>11,94</b>	-1,30
RTCIAT899_PB00645	<i>nodA3</i>		3,36	1,19
RTCIAT899_PB02710	<i>nodM</i>	NB3	<b>5,85</b>	1,08
RTCIAT899_PB00575	<i>y4wE</i>	NB4	<b>12,17</b>	-1,64
RTCIAT899_PB00570	<i>y4wF</i>	NB4	<b>7,11</b>	-1,49
RTCIAT899_PB01550		NB5	<b>28,65</b>	1,15
RTCIAT899_PB01545		NB5	<b>14,37</b>	1,04

En rojo se muestran los genes reprimidos y en negro los genes activados. En negrita se muestran los genes diferencialmente expresados. Los datos de inducción muestran el número de veces que se indujo ese gen respecto a la estirpe parental en condiciones control.

Por otro lado, en presencia de apigenina, de los diez genes *nod* diferencialmente activados en la estirpe silvestre, seis lo siguieron siendo para el mutante  $\Delta araC$  (*nodA1BC* y *nodA2FE*) (**Tabla 49**). Además, el gen *nodM*, que no estaba diferencialmente activado con apigenina en la estirpe silvestre (2,43), se sobreexpresó en el mutante (7,29). Por otra parte, el gen *y4wE* que fue diferencialmente activado en la estirpe parental también lo fue en el mutante  $\Delta araC$ . Sin embargo, esto no ocurrió en los genes *RTCIAT899\_PB01550* y *RTCIAT899\_PB01545*, ya que los niveles de inducción en la estirpe mutante no alcanzaron los valores significativos de este estudio transcriptómico. Todos estos datos indican que AraC interviene en la activación de los genes *nod* en presencia de estrés salino, correlacionándose con los resultados observados anteriormente en los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa.

**Tabla 49 – Expresión diferencial de todos los genes *nod* o de los genes regulados por NB y diferencialmente expresados en *R. tropici* CIAT 899 y el mutante  $\Delta araC$  en presencia de 3,7  $\mu$ M de apigenina con respecto al control.**

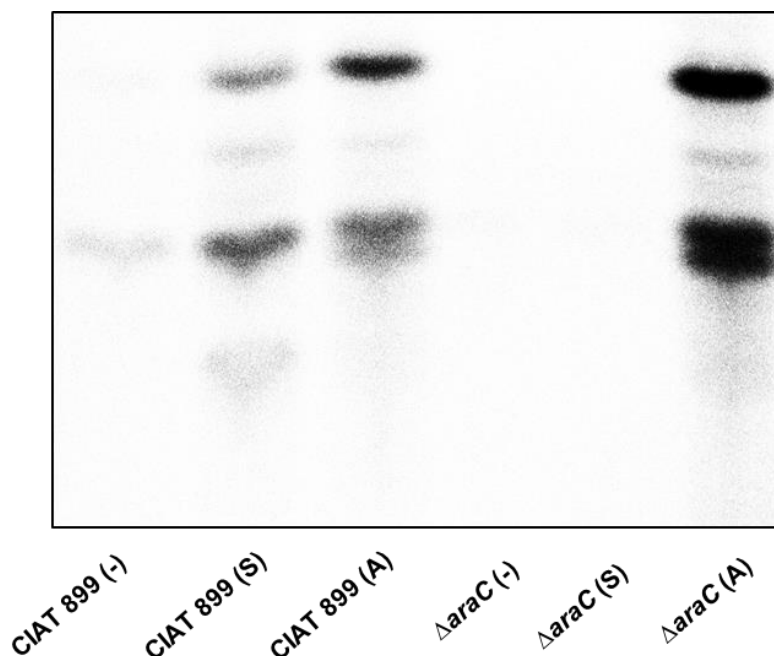
Número de acceso NCBI/ID	Gen	NB	Inducción en CIAT 899	Inducción en $\Delta araC$
RTCIAT899_PB01295	<i>nodD1</i>		1,23	3,10
RTCIAT899_PB01070	<i>nodD2</i>	NB9	-1,25	1,10
RTCIAT899_PB00640	<i>nodD3</i>		-1,21	1,16
RTCIAT899_PB01560	<i>nodD4</i>		1,09	-1,03
RTCIAT899_PB00560	<i>nodD5</i>		-1,12	-1,16
RTCIAT899_PB01300	<i>nodA1</i>	NB1	8,73	6,97
RTCIAT899_PB01305	<i>nodB</i>	NB1	11,4	6,57
RTCIAT899_PB01310	<i>nodC</i>	NB1	6,69	4,62
RTCIAT899_PB01315	<i>nodS</i>	NB1	7,53	3,49
RTCIAT899_PB01320	<i>nodU</i>	NB1	5,39	3,40
RTCIAT899_PB01325	<i>nodI</i>	NB1	6,59	2,23
RTCIAT899_PB01330	<i>nodJ</i>	NB1	4,98	1,32
RTCIAT899_PB01340	<i>nodH</i>	NB1	3,09	1,50
RTCIAT899_PB01345	<i>nodP</i>	NB1	2,78	1,15
RTCIAT899_PB01350	<i>nodQ</i>	NB1	3,25	-1,13
RTCIAT899_PB01095	<i>nodA2</i>	NB2	10,3	9,07
RTCIAT899_PB01115	<i>nodF</i>	NB2	13,39	7,54
RTCIAT899_PB01120	<i>nodE</i>	NB2	10,37	6,73
RTCIAT899_PB00645	<i>nodA3</i>		1,15	3,87
RTCIAT899_PB02710	<i>nodM</i>	NB3	2,43	7,29
RTCIAT899_PB00575	<i>y4wE</i>	NB4	8,58	5,16
RTCIAT899_PB01550		NB5	6,75	2,46
RTCIAT899_PB01545		NB5	4,26	1,92

En rojo se muestran los genes reprimidos y en negro los genes activados. En negrita se muestran los genes diferencialmente expresados. Los datos de inducción muestran el número de veces que se indujo ese gen respecto a la estirpe parental en condiciones control.

### *La síntesis de FN en presencia de estrés salino está regulada por AraC*

A continuación, se estudió si la ausencia de activación de los genes *nod* en estrés salino observada en la estirpe  $\Delta araC$  se correlacionaba con la ausencia de síntesis de FN en estas mismas condiciones. Para ello, en primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de TLC siguiendo la misma metodología empleada a lo largo de esta Tesis

Doctoral (**Figura 32**). Los resultados mostraron que la estirpe mutante  $\Delta araC$  no produjo FN bajo estrés salino, y en cambio, sí lo hizo en presencia de apigenina.



**Figura 32 – Ensayos de TLC en la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 y el mutante  $\Delta araC$  en condiciones control (-), NaCl 300 mM (S) y 3,7  $\mu$ M apigenina (A).**

Además se realizaron análisis de espectrometría de masas en las mismas condiciones en las que se hicieron los ensayos de TLC. Tal y como se indica en la **Tabla 50**, el mutante  $\Delta araC$  sintetizó tan solo cuatro FN en comparación con los 36 FN que se observaron en la estirpe parental bajo estrés salino. Además, en presencia de apigenina, ambas estirpes sintetizaron prácticamente el mismo número de FN (29 en la silvestre y 28 en el mutante) lo que apoyó el hecho de que AraC podría actuar exclusivamente en condiciones de estrés salino. Finalmente, también llamó la atención la ausencia de FN en condiciones control en el mutante  $\Delta araC$  que solo produjo un factor frente a los 11 que sintetizó la estirpe parental.

En conclusión, estos datos confirmaron el papel de AraC en la síntesis de FN bajo estrés salino.

Tabla 50 – FN producidos por la estirpe parental *R. tropici* CIAT 899 y el mutante  $\Delta araC$  en condiciones control (B-), NaCl 300 mM y apigenina 3,7  $\mu$ M.

Condición/Estirpe	CIAT 899	$\Delta araC$
Control	11	1
NaCl	36	4
Apigenina	29	28

### Ensayos de nodulación de *R. tropici* CIAT 899 y $\Delta araC$ en *P. vulgaris* y *L. leucocephala*

Finalmente, se estudió si la mutación en el gen  $\Delta araC$  tenía algún fenotipo en simbiosis con leguminosas. Así, se realizaron ensayos de nodulación en *P. vulgaris* y *L. leucocephala* en comparación con la estirpe silvestre (**Tabla 51**). Los resultados mostraron que, en ambas leguminosas, el mutante  $\Delta araC$  indujo un menor y significativo NN en comparación con la estirpe parental. No obstante, la disminución del NN no se correlacionó con un menor PSPA en comparación con CIAT 899.

Tabla 51 – Fenotipo simbiótico de *R. tropici* CIAT 899 y el mutante  $\Delta araC$  en *P. vulgaris* y *L. leucocephala*.

Estirpes	<i>P. vulgaris</i>		<i>L. leucocephala</i>	
	NN	PSPA (g)	NN	PSPA (g)
CIAT 899	211,25 $\pm$ 47,85	1,09 $\pm$ 0,28	13,27 $\pm$ 2,09	0,26 $\pm$ 0,10
$\Delta araC$	<b>133,33 <math>\pm</math> 28,94*</b>	0,96 $\pm$ 0,30	<b>5,46 <math>\pm</math> 2,37*</b>	0,20 $\pm$ 0,08
No inóculo	<b>0 <math>\pm</math> 0*</b>	<b>0,58 <math>\pm</math> 0,17*</b>	<b>0 <math>\pm</math> 0*</b>	<b>0,12 <math>\pm</math> 0,03*</b>

Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos para la estirpe parental CIAT 899 mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores marcados con \* y en negrita son significativamente diferentes a niveles de  $\alpha = 5\%$ .

Como resultado de todo el trabajo presentado, se han publicado seis artículos en los que el doctorando es primer autor.

1) del Cerro, P., Rolla-Santos, A.A.P., Gomes, D.F., Marks, B.B., Pérez-Montaña, F., Rodríguez-Carvajal, M.A., *et al.* (2015a). Regulatory *nodD1* and *nodD2* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 and their roles in the early stages of molecular signaling and host-legume nodulation. *BMC Genomics*, 16, 251.

2) del Cerro, P., Rolla-Santos, A.A.P., Gomes, D.F., Marks, B.B., Espuny, M.R., Rodríguez-Carvajal, M.A., *et al.* (2015b). Opening the “black box” of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899. *BMC Genomics*, 16, 864.

3) del Cerro, P., Rolla-Santos, A.A., Valderrama-Fernández, R., Gil-Serrano, A., Bellogín, R.A., Gomes, D.F., *et al.* (2016). NrcR, a new transcriptional regulator of *Rhizobium tropici* CIAT 899 involved in the legume root-nodule symbiosis. *PLOS ONE*, 11, e0154029.

4) Pérez-Montaña, F. \*, del Cerro, P. \*, Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F.J., Cubo, M.T., Hungria, M., Megías, M., & Ollero, F.J. (2016a). RNA-seq analysis of the *Rhizobium tropici* CIAT 899 transcriptome shows similarities in the activation patterns of symbiotic genes in the presence of apigenin and salt. *BMC Genomics*, 17, 198.

\*Estos autores han contribuido por igual.

5) del Cerro, P., Pérez-Montaña, F., Gil-Serrano, A., López-Baena, F. J., Megías, M., Hungria, M., & Ollero, F.J. (2017). The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. *Scientific Reports*, 7, 46712.

6) del Cerro, P., Megías, M., López-Baena, F.J., Gil-Serrano, A., Pérez-Montaña, F., & Ollero, F.J. (2019). Osmotic stress activates *nif* and *fix* genes and induces the *Rhizobium tropici* CIAT 899 Nod factor production via NodD2 by up-regulation of the *nodA2* operon and the *nodA3* gene. *PLOS ONE*, 14, e0213298.





## DISCUSIÓN

---



## Discusión general

Satisfacer la demanda alimentaria, que supone el incremento de la población mundial en los últimos años, es uno de los retos más importantes que tiene nuestra sociedad, ya que se prevé que la población mundial aumente en más de un tercio (2300 millones de personas) entre 2009 y 2050. Por lo tanto, la agricultura mundial se enfrenta a múltiples retos durante este siglo XXI: hay que producir más alimentos para alimentar a una población creciente, así como obtener más materias primas que sostengan estas actividades en expansión y que se adapten al reto de frenar el cambio climático. También, la agricultura debe contribuir al desarrollo global de numerosos países en desarrollo por medio de métodos de producción más eficaces y sostenibles. En este contexto, los métodos de obtención de fertilizantes nitrogenados son mayormente dependientes de la industria agroquímica, que por medio de la reacción de Haber-Bosch proporciona el 98% del nitrógeno incorporado al suelo como fertilizantes en la agricultura mundial (Estupinan y Quesada, 2011). Este proceso industrial tiene un alto coste energético y, por tanto, no se ajusta a los retos que tiene nuestro planeta en futuras décadas.

Una posible solución a este problema es la aplicación de organismos fijadores de nitrógeno atmosférico en la industria agrícola. Así, la simbiosis rizobio-leguminosa ofrece un punto de partida a la aplicación de organismos que actúen como fertilizantes nitrogenados en una agricultura sostenible, y como alternativa al uso de fertilizantes químicos contaminantes. De este modo, el estudio de los mecanismos de regulación de esta simbiosis, tanto en la bacteria como en la planta, deben ser una prioridad para su posterior aplicación y su traslación a otros sistemas, como son los cultivos de plantas no-leguminosas.

## Interpretación de los datos transcriptómicos

En la presente Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo el estudio de la regulación de la síntesis de FN en *R. tropici* CIAT 899, un rizobio que debido a sus características, lo

han convertido en un buen inoculante para su aplicación en agricultura. De hecho, su amplio rango de nodulación, la resistencia a diversos estreses abióticos y la capacidad de producir FN bajo estrés osmótico independientemente de flavonoides ha incrementado el interés de estudio de esta estirpe en los últimos años (Hungria *et al.*, 2000; Estévez *et al.*, 2009; Guasch-Vidal *et al.*, 2013). La secuenciación del genoma de CIAT 899, llevada a cabo en 2012, fue el primer paso para conocer cómo es la regulación de la síntesis de los FN en este rizobio (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012). De hecho, esta secuenciación ha permitido que en la presente Tesis Doctoral se lleven a cabo estudios transcriptómicos globales por ARNseq para así conocer la expresión de cada uno de los genes de CIAT 899 en distintas condiciones. Así, las condiciones de interés elegidas fueron: flavonoide apigenina (3,7  $\mu$ M), estrés osmótico iónico (300 mM NaCl) y estrés osmótico no iónico por manitol (400 mM manitol). Estos estudios han permitido determinar qué genes relacionados con la síntesis de FN se activan en las condiciones ensayadas. Así, en un primer momento, se confirmó que varios de los genes *nod* se activan tanto en presencia del flavonoide inductor apigenina como de dos tipos de estrés osmótico (iónico y no iónico), algo que ya se esperaba debido a los altos niveles de activación del promotor de *nodA* observados en los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en la estirpe CIAT 899 portando el plásmido pMP240 (**Figura 13**).

Cabe destacar que, en presencia de estrés salino, hasta 14 genes *nod* (de un total de 20 que hay en el genoma según la anotación actual) se activaron diferencialmente en comparación con los 10 genes *nod* activados en presencia de flavonoide apigenina (**Tabla 52**). Este dato muestra que la activación de los genes *nod* en presencia de estrés salino se da en los mismos niveles que la ya descrita activación por flavonoides, y por tanto, debe responder a un mecanismo de regulación coordinado. En cambio, en condiciones de estrés osmótico no iónico (manitol), tan solo cinco genes *nod* (*nodD1*, *nodA2*, *nodA3*, *nodF* y *nodE*) se activaron diferencialmente. El hecho de que en este estrés osmótico no iónico no se activaran diferencialmente todos los genes esenciales en la síntesis de FN, como *nodB* y *nodC*, podría indicar la existencia de un mecanismo de regulación diferente, o que las condiciones y los medios en los que se han llevado a cabo este ARNseq no son idóneos para estudiar esta condición, ya que los valores de activación del promotor de *nodA* en el ensayo de actividad  $\beta$ -

galactosidasa sí fueron similares a los observados en las condiciones de apigenina o estrés salino (**Figura 13**).

**Tabla 52 – Expresión diferencial de todos los genes *nod* descritos en *R. tropici* CIAT 899 en presencia de 300 mM de NaCl, 400 mM de manitol y 3.7 µM de apigenina.**

Número de acceso NCBI/ID	Gen	NB	Inducción NaCl	Inducción manitol	Inducción apigenina
RTCIAT899_PB01295	<i>nodD1</i>		1,04	<b>4,63</b>	1,23
RTCIAT899_PB01070	<i>nodD2</i>	NB9	3,01	2,28	<b>-1,25</b>
RTCIAT899_PB00640	<i>nodD3</i>		2,1	1,6	<b>-1,21</b>
RTCIAT899_PB01560	<i>nodD4</i>		1,16	1,48	1,09
RTCIAT899_PB00560	<i>nodD5</i>		<b>-1,09</b>	1,84	<b>-1,12</b>
RTCIAT899_PB01300	<i>nodA1</i>	NB1	<b>13,66</b>	<b>-1,15</b>	<b>8,73</b>
RTCIAT899_PB01305	<i>nodB</i>	NB1	<b>19,01</b>	2,07	<b>11,4</b>
RTCIAT899_PB01310	<i>nodC</i>	NB1	<b>12</b>	1,47	<b>6,69</b>
RTCIAT899_PB01315	<i>nodS</i>	NB1	<b>12,89</b>	1,45	<b>7,53</b>
RTCIAT899_PB01320	<i>nodU</i>	NB1	<b>10,18</b>	2,10	<b>5,39</b>
RTCIAT899_PB01325	<i>nodI</i>	NB1	<b>12,48</b>	1,71	<b>6,59</b>
RTCIAT899_PB01330	<i>nodJ</i>	NB1	<b>10,15</b>	1,29	<b>4,98</b>
RTCIAT899_PB01340	<i>nodH</i>	NB1	<b>7,6</b>	1,38	3,09
RTCIAT899_PB01345	<i>nodP</i>	NB1	<b>6,08</b>	<b>-1,07</b>	2,78
RTCIAT899_PB01350	<i>nodQ</i>	NB1	<b>6,39</b>	<b>-1,34</b>	3,25
RTCIAT899_PB01095	<i>nodA2</i>	NB2	<b>9,81</b>	<b>2,57</b>	<b>10,3</b>
RTCIAT899_PB01115	<i>nodF</i>	NB2	<b>13,43</b>	<b>3,49</b>	<b>13,39</b>
RTCIAT899_PB01120	<i>nodE</i>	NB2	<b>11,94</b>	<b>2,72</b>	<b>10,37</b>
RTCIAT899_PB00645	<i>nodA3</i>		3,36	<b>3,59</b>	1,15
RTCIAT899_PB02710	<i>nodM</i>	NB3	<b>5,85</b>	2,30	2,43

En rojo se muestran los genes reprimidos y en negro los genes activados. En negrita se muestran los genes diferencialmente expresados ( $\pm 4$  para NaCl y apigenina,  $\pm 2,5$  para manitol). Los datos de inducción muestran el número de veces que fue inducido ese gen respecto a la estirpe parental en condiciones control.

Tras la secuenciación del genoma de CIAT 899, se comprobó que los genes de nodulación se agrupaban en dos grandes operones (*nodA1BCSUIJHPQ* y *nodA2hsnTnodFE*) y que cada uno está precedido por las cajas NB1 y NB2, respectivamente (**Figura 10**). De hecho, todas las NB presentes en el genoma de CIAT 899 han sido localizadas en la presente Tesis Doctoral (**Figura 12**). De un total de diez NB que hay en el genoma de CIAT 899, se activaron seis NB (NB1-NB5 y

NB7) en presencia de estrés salino, cuatro NB (NB1, NB2, NB4 y NB5) en presencia de apigenina y la NB2 bajo estrés por manitol. Estos resultados indican que, aunque se están activando los genes *nod*, no se inducen los mismos genes en las distintas condiciones. Las NB6 y NB8-NB10 no se han activado diferencialmente en ninguna de las condiciones en las que se ha trabajado en la presente Tesis Doctoral. Esto podría indicar que no son funcionales o que se activarían en otras condiciones no estudiadas.

Como era previsible, en las transcriptómicas llevadas a cabo en las condiciones de apigenina y estrés salino, los dos operones principales de genes *nod* se activaron diferencialmente, confirmando que la maquinaria simbiótica de CIAT 899 se induce en estas condiciones. Sin embargo, bajo estrés osmótico por manitol, el operón *nodA1BCSUIJHPQ* no se activó diferencialmente ya que no alcanzó los niveles de expresión diferencial del estudio, aunque sí se activó el operón *nodA2hsnTnodFE*. Este resultado no indica que estos genes *nodA1BC* no se expresen en estas condiciones, ya que en los ensayos de TLC sí se detectó la síntesis de FN bajo estrés por manitol (**Figura 22**). Por lo tanto, este hecho parece indicar que estos genes *nod* comunes, responsables de sintetizar el esqueleto de la molécula, podrían estar expresándose a nivel basal en las condiciones de estrés por manitol. De hecho, como se ha demostrado, CIAT 899 sintetiza un pequeño número de FN incluso sin moléculas inductoras, lo que indica que los genes *nodA1BC* se expresan basalmente en ausencia de moléculas inductoras.

Otro dato que llama mucho la atención en los estudios de ARNseq fue que en presencia de apigenina, solamente 19 genes del genoma de CIAT 899 (diez de ellos genes *nod*) fueron diferencialmente expresados, indicando que la maquinaria simbiótica de CIAT 899 está regulada por un número muy reducido de genes. Este hecho contrasta con estudios de ARNseq realizados en otros rizobios, como *S. fredii* HH103, en los que se detectan hasta 100 genes diferencialmente expresados en respuesta al flavonoide inductor genisteína (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b). Por tanto, parece que existen diferentes formas de regulación de los genes de la maquinaria simbiótica en estos dos rizobios. Por un lado, la regulación en CIAT 899 parece ser

más simple que la que se produce en HH103 donde se necesitaría la activación de un gran número de genes para el establecimiento de una simbiosis efectiva. De hecho, en el caso de HH103, no solo se activan los genes de nodulación, sino que también otros operones de genes se requieren para establecer la simbiosis, como son los genes del SST3, que son cruciales en el establecimiento de la simbiosis con diferentes variedades de soja (López-Baena *et al.*, 2008). Esto no se sucede en CIAT 899, ya que únicamente cuenta con genes pertenecientes a los SST1, SST4 y SST5 (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012). A pesar de que estos sistemas de secreción de proteínas ni se indujeron ni se reprimieron en presencia de flavonoide ni de estrés osmótico en CIAT 899, no se puede descartar que pudieran tener un papel relevante en la simbiosis con leguminosas.

Sorprendentemente, en los estudios transcriptómicos llevados a cabo bajo estrés osmótico (tanto estrés salino como estrés por manitol) se ha observado que, además de los genes *nod*, ciertos genes relacionados con la fijación de nitrógeno (genes *fix* y *nif*) se expresan diferencialmente (**Tablas 33 y 34**). En cambio, tal y como se esperaba, un gran número de genes relacionados con la tolerancia al estrés osmótico también se expresaron diferencialmente en estas condiciones. De hecho, la mayoría de los procesos relacionados con la tolerancia a estrés osmótico tanto iónico como no iónico son similares. Aunque el objetivo de esta Tesis Doctoral no es el de estudiar la resistencia a estrés de CIAT 899, estos datos han aportado mucha información relevante. Por un lado, se activaron numerosos genes relacionados con el metabolismo, como son los procesos de obtención de energía (ATP sintasas), la traducción de proteínas (ribosomas) y otros genes relacionados con el correcto plegamiento de proteínas (chaperonas), lo que podría relacionarse con la tolerancia de la bacteria ante estas condiciones estresantes. Sin embargo, se reprimieron genes relacionados con procesos de movilidad (flagelo, quimiotaxis y pili de tipo IV) y de síntesis de polisacáridos (KPS y EPS). Este hecho supone una aparente contradicción, ya que una mayor movilidad permitiría escapar a los rizobios del estrés, o una mayor producción de KPS y EPS protegerían al rizobio del estrés abiótico (Janczarek, 2011). No obstante, en términos de simbiosis, la inhibición de estos genes se podría explicar de diferentes maneras. Por un lado, se ha visto que los rizobios que están avanzando por el tubo de infección no presentan movilidad flagelar ya que se

mueven siguiendo la movilidad de tipo *sliding* (Fournier *et al.*, 2008). Además, los flagelos tampoco son necesarios una vez colonizado el nódulo ya que los rizobios se diferenciarán en bacteroides. En cuanto a la producción de polisacáridos, aunque es relevante en los procesos de colonización de la raíz de la leguminosa por parte del rizobio, se ha visto en algunos rizobios como *S. fredii* HH103 que la cantidad de EPS disminuye en presencia de genisteína y esto es beneficioso en el establecimiento de simbiosis con *G. max* (Acosta-Jurado *et al.*, 2016b), lo que podría también suceder en la infección de CIAT 899. En contraposición con esto, los GC de los rizobios tienen un efecto osmoprotector en los rizobios, y en HH103, estas moléculas son esenciales en el establecimiento de la simbiosis con *G. max* y *Glycyrrhiza uralensis* (Breedweld y Miller, 2012; Crespo-Rivas *et al.*, 2009). En CIAT 899 no se ha estudiado el papel de los GC en simbiosis. No obstante, el gen *ndvA* que se encarga del transporte de los GC hacia el exterior se activa diferencialmente bajo estrés por manitol, lo que podría indicar que los GC en CIAT 899 podrían también ser relevantes en el establecimiento de la simbiosis con leguminosas.

Por otra parte, los genes relacionados con la síntesis de AIA de CIAT 899 (*y4wEF*), que forman un operón regulado bajo la NB4, se activaron diferencialmente tanto en presencia de apigenina (sólo el gen *y4wE* alcanzó los niveles de significación) como de estrés salino. Además, esta activación fue dependiente de NodD1 y NodD2, respectivamente (**Figura 23**). Aunque no es la primera vez que se observa que en los rizobios la síntesis de AIA se induce en presencia de flavonoides y que esta producción está regulada por NodD (Theunis *et al.*, 2002), hasta la fecha no se había observado que los rizobios sinteticen AIA en presencia de estrés osmótico. Este fenotipo sugiere que la síntesis de AIA por parte de CIAT 899 podría influir en el establecimiento de la simbiosis con leguminosas tal y como se ha demostrado recientemente, donde un mutante polar en el gen *y4wF* provoca un retraso en la nodulación en *P. vulgaris* (Tullio *et al.*, 2019).

Otro gran grupo de genes diferencialmente reprimidos en condiciones de estrés osmótico (tanto estrés salino como estrés por manitol) es el de aquellos genes que codifican para transportadores de membrana (**Figuras 16 y 17**). Un estudio anterior



muestra que CIAT 899 acumula trehalosa, manitol y glutamato como moléculas compatibles en condiciones de estrés salino (Fernández-Aunión *et al.*, 2010). Por tanto, el número de transportadores podría verse reducido con el fin de ayudar en la acumulación de estas moléculas en el citoplasma. En este contexto, el gen *glpD* responsable del catabolismo de glicerol se reprimió bajo estrés por manitol. No obstante, los genes *thuAB* relacionados con el catabolismo de trehalosa se activaron en presencia de ambos estreses osmóticos, lo que es contradictorio *a priori* con los resultados esperados. La explicación podría radicar en que la trehalosa, que es tóxica para las plantas, se degradaría en condiciones de la activación de los genes *nod*, es decir, en condiciones simbióticas. Para resolver este problema, las bacterias producirían enzimas que mantienen controlados los niveles de trehalosa (Boboye, 2004). Todos estos datos, junto con el incremento en la producción de NF y AIA bajo estrés salino, nos permite formular la siguiente pregunta: ¿Podría el establecimiento de la simbiosis representar una estrategia de CIAT 899 para asegurar la supervivencia bajo estrés abiótico? En cambio, las leguminosas noduladas por CIAT 899 no soportan las condiciones salinas que activan los genes *nod* en la bacteria. Otra cuestión es que las condiciones del estrés osmótico mimeticen las condiciones que se pueden dar en el interior de la planta, por ejemplo, en el interior del tubo de infección. Por esto, esta activación de los genes *nod* provocaría una segunda oleada de biosíntesis de FN que podría ser importante en simbiosis. Otra posibilidad es que, en zonas concretas de la rizosfera, se den condiciones de alta presión osmótica que favorezca la síntesis de FN.

## En la activación de la síntesis de los FN en *R. tropici* CIAT 899 intervienen diferentes reguladores transcripcionales

Otro de los objetivos de la presente Tesis Doctoral fue la búsqueda de los reguladores de la síntesis de FN en presencia de estrés osmótico. A finales del siglo pasado se demostró que los reguladores NodD llevan a cabo la activación de los genes *nod* en respuesta al flavonoide adecuado. De hecho, en CIAT 899, NodD1 es el responsable de la activación de los genes *nod* en respuesta a apigenina, aunque no lo es en presencia de estrés osmótico (Guasch-Vidal *et al.*, 2013). Ya que en la secuenciación de CIAT 899 se comprobó que existen cinco copias del gen *nodD* en el plásmido

simbiótico, parece probable que alguna de estas copias fuese el candidato para la activación de los genes *nod* bajo estrés osmótico. Tras la obtención de los mutantes individuales de cada gen *nodD* se identificó a la proteína NodD2 como el regulador de los genes *nod* bajo estrés osmótico (tanto estrés salino como en estrés por manitol), tal y como muestran los diferentes experimentos llevados a cabo. Como ya se sabía, estos mismo experimentos confirmaron que NodD1 es el activador de los genes *nod* en presencia de flavonoide inductor (**Figuras 19, 21 y 22**) (**Tablas 35-37**).

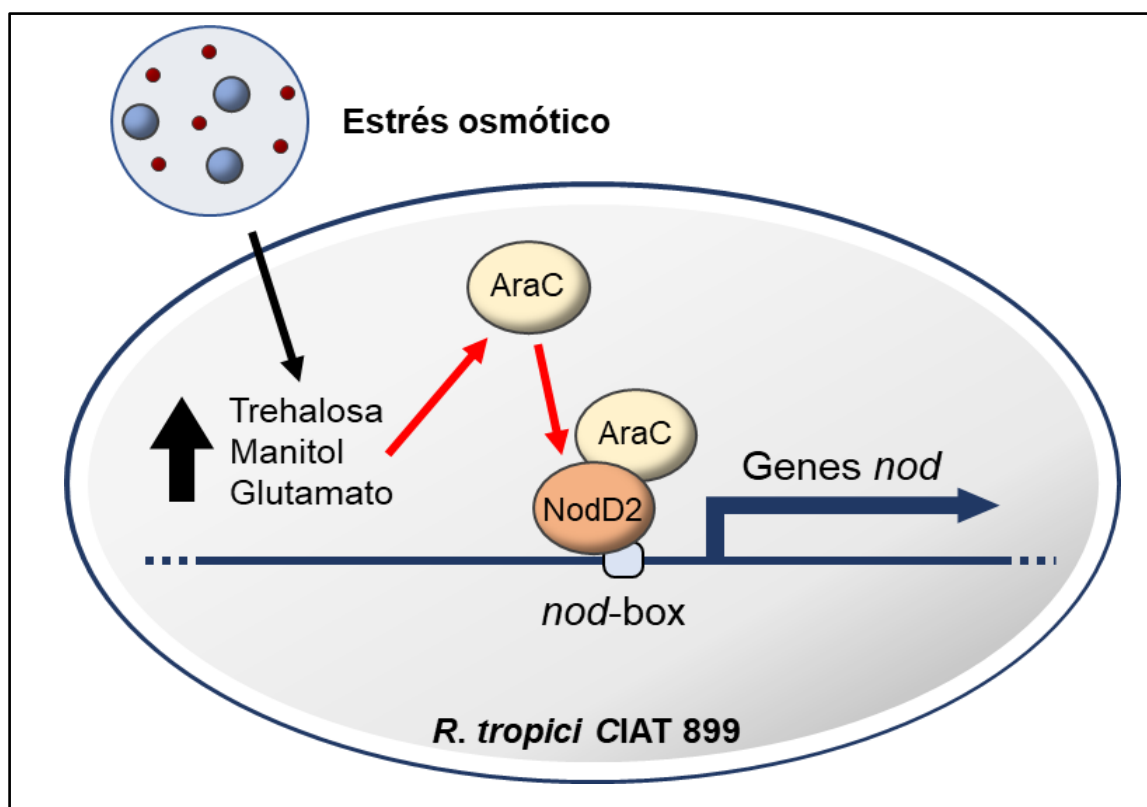
De este modo, en *R. tropici* CIAT 899 existen dos vías de activación de los genes *nod* y de síntesis de FN, una activada por flavonoides y regulada por NodD1, y la otra activada por estrés osmótico y regulada por NodD2. Aunque existen muchos estudios que han demostrado que NodD es activado por flavonoides, no existe ninguna evidencia bioquímica que demuestre la interacción directa entre ambos, como tampoco existe datos cristalográficos de esta proteína (Peck *et al.*, 2013). Quizás, los métodos de expresión de proteínas heteróloga *in vitro* no son de momento los adecuados para mantener esta proteína soluble. De hecho, cuando se ha expresado y purificado NodD de *S. meliloti* ha sido necesaria la purificación conjunta de las chaperonas GroESL de *E. coli*, ya que estas chaperonas parece que son necesarias (las de los rizobios) para el correcto plegamiento de NodD, y por tanto, para la activación de los genes *nod* (Yeh *et al.*, 2002). Recientemente se ha observado que un regulador transcripcional NodD-like (FdeR) de *Herbaspirillum seropedicae* interacciona con los flavonoides naringenina y crisina *in vitro*, lo que sugiere que NodD también podría unirse directamente a los flavonoides (Wassem *et al.*, 2017). Sin embargo, cabe preguntarse cómo la presencia de un estrés osmótico podría cambiar la conformación de una proteína, en este caso NodD2, para que esta pase a una forma activa. Puede darse el caso de que otros elementos deben intervenir en esta vía de activación. Así, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha priorizado la búsqueda de nuevos elementos que intervengan en la vía de síntesis de FN bajo estrés osmótico. De esta forma, se han identificado otros dos reguladores que actúan en presencia de estrés osmótico: NrcR y AraC.

Por un lado, NrcR, que presenta una identidad del 46% y de 65% de residuos positivos con el regulador NodR, que es un regulador transcripcional que reprime la transcripción de los genes *nod* (Kondorosi *et al.*, 1989; Kondorosi *et al.*, 1991; Cren *et al.*, 1995). Sin embargo, NrcR promueve la activación del gen *nodC* tanto en presencia de apigenina como de estrés salino según experimentos de qRT-PCR (**Figura 27**). No obstante, NrcR no es esencial para la activación de *nodC* en estas condiciones ya que los niveles de activación del gen *nodC* fueron superiores a las condiciones control en el fondo mutante *nrcR::Ω*. Por el contrario, en los análisis por espectrometría de masas se detectaron un mayor número de FN diferentes en presencia de estrés salino en el mutante *nrcR::Ω* respecto a los obtenidos en la misma condición en la estirpe silvestre (**Tabla 46**). Así, aunque NrcR no es esencial en la regulación de la síntesis de FN en CIAT 899, este regulador podría regular la aparición de FN con nuevas decoraciones en condiciones de estrés, lo que a su vez podría aumentar el rango de nodulación de este rizobio, sugiriendo de nuevo que la nodulación podría ser una vía de escape al estrés y/o que el estrés osmótico está presente durante el establecimiento de la simbiosis. Además, otros fenotipos relacionados con la simbiosis como la producción EPS y la movilidad de superficie se vieron inhibidos por NrcR (**Figuras 29 y 30**). Este resultado concuerda con la inhibición de genes de síntesis de EPS y de movilidad que se observó en los estudios transcriptómicos. Todo esto podría explicar el fenotipo simbiótico que presentó el mutante *nrcR::Ω* en plantas de *P. vulgaris* y *L. leucocephala* (**Figura 28**) (**Tabla 47**). Así, NrcR podría actuar durante el establecimiento de la simbiosis incluso en presencia de estrés osmótico.

Por lo que respecta al regulador AraC, los resultados obtenidos mostraron que, al igual que NodD2, AraC es también esencial para la activación de los genes *nod* y la síntesis de FN en presencia de estrés salino, mientras que en presencia de flavonoide apigenina no se observaron diferencias con respecto a la estirpe silvestre (**Figuras 31 y 32**) (**Tablas 48 y 49**). Este resultado es especialmente interesante ya que hasta la fecha no se ha identificado un regulador esencial para la activación de los genes *nod* diferente a las proteínas NodD. La familia de reguladores AraC es muy amplia y regula diferentes procesos metabólicos, de respuesta a estrés o de virulencia en patógenos (Gallegos *et al.*, 1997). Por ello, el descubrimiento de un AraC que regula procesos simbióticos ha otorgado una nueva función a la familia de proteínas AraC. Los

reguladores AraC, al igual que NodD, también poseen en general dominios de unión a ligando y de unión a ADN. Ante la pregunta de cómo AraC se podría activar en CIAT 899 en presencia de estrés osmótico, existen muchas respuestas posibles. Originalmente, se observó que la activación de los reguladores AraC ocurre en presencia de arabinosa en el citoplasma, que actúa como ligando de este regulador y promueve la activación de los genes del catabolismo de este azúcar en bacteria (Khlebnikov *et al.*, 2000). Como se ha comentado anteriormente, se sabe que CIAT 899 resiste al estrés osmótico mediante la acumulación de solutos compatibles como la trehalosa, el manitol y el glutamato en su citoplasma (Fernández-Aunión *et al.*, 2010). Así, no sería descabellado pensar que la acumulación de estas moléculas compatibles en CIAT 899 pudieran activar al regulador AraC, que a su vez podría activar a NodD2 o la transcripción del gen *nodD2* (**Figura 33**). De hecho, la expresión diferencial del gen *nodD2* en estrés salino pasó de 3,01 en la estirpe silvestre a -1,28 en el fondo mutante  $\Delta araC$  (**Tabla 48**). Además, podría ser que el papel de AraC en simbiosis no se produzca exclusivamente en presencia de estrés osmótico. Este regulador se encuentra ampliamente distribuido en un gran número de rizobios que solo pueden activar a los genes *nod* en presencia de flavonoides, por lo que no se puede descartar que también en estos rizobios pudiesen tener una función importante en simbiosis. De hecho, CIAT 899 tiene hasta 21 reguladores de tipo AraC en su genoma, cuatro de ellos en el plásmido simbiótico, por lo que los otros reguladores de tipo AraC podrían ser también activados por flavonoides y/o otras moléculas inductoras en esta misma estirpe (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012). Futuros trabajos aclararán este punto.

A pesar de lo comentado anteriormente, otros elementos podrían actuar también en la vía de activación de la síntesis de FN en los rizobios. De hecho, recientemente se ha demostrado que en *R. leguminosarum* se producen incrementos transitorios en la concentración de calcio citoplasmático en presencia del flavonoide inductor, y este proceso es necesario para la activación transcripcional de los genes *nod* a través de NodD (Moscatiello *et al.*, 2010).



**Figura 33 – Posible actuación de AraC en condiciones de estrés osmótico en *R. tropici* CIAT 899. Las flechas negras representan activación descrita. Las flechas rojas representan una hipotética activación.**

Los datos transcriptómicos obtenidos en esta Tesis Doctoral también sugieren que NodD1 podría intervenir en la vía de activación de los genes *nod* bajo estrés osmótico. Esto se deduce del hecho de que los valores de inducción de los genes *nod* en el mutante en gel *nodD1* (RSP82) en presencia de estrés salino no alcanzaron los mismos valores que los observados en la estirpe silvestre en la misma condición (**Tabla 52**). De hecho, de los 14 genes *nod* diferencialmente activados en la estirpe silvestre en presencia de estrés salino, solo tres (*nodA2*, *nodF*, *nodE*) lo seguían haciendo en el mutante RSP82 en las mismas condiciones. Por tanto, no hay que descartar que NodD1 pudiera estar implicado también en promover la activación de los genes *nod* en presencia de estrés osmótico. En esta Tesis Doctoral, el gen *nodD2* tuvo cierta expresión diferencial (3,01) en presencia de estrés salino respecto a las condiciones control, lo que no ocurre en el fondo genético de RSP82 (1,02). En este contexto, el regulador NodD1 de *S. fredii* HH103 reprime la expresión del propio gen *nodD1* (Vinardell *et al.*, 2004b). De hecho, en CIAT 899 se ha detectado una *nod-box* (NB9) aguas arriba del gen *nodD2*. Todos estos datos podrían sugerir que NodD1 podría promover la activación transcripcional de *nodD2* bajo estrés salino. Una posible

explicación para esta inducción podría ser que NodD1 activase al gen *nodD2* que a su vez es el responsable de la activación de los genes *nod* en condiciones de estrés osmótico.

## Hasta tres genes *nodA* garantizan la síntesis de FN en *R. tropici* CIAT 899

La secuenciación del genoma de CIAT 899 también ha mostrado la existencia de tres copias del gen *nodA*, dos de ellas (*nodA1* y *nodA2*) se localizan en los dos grandes operones de genes *nod* y están regulados por la NB1 y NB2 (**Figura 10**). En cambio, es sorprendente que el gen *nodA3* carezca de *nod*-box. En este contexto, el número de transcritos observados en los estudios de ARNseq muestran que *nodA3* podría tener una expresión constitutiva alta, independientemente de la presencia o no de inductores de los genes *nod* (Datos disponibles en NCBI: PRJNA305690). Este hecho podría explicar, en parte, la presencia de FN en condiciones control sin inducir en los ensayos de espectrometría de masas realizados en esta Tesis Doctoral y en estudios anteriores (Guasch-Vidal *et al.*, 2013) (**Tablas 38, 46 y 50**).

Como ya se ha indicado anteriormente, los genes *nodA1*, *nodA2* y el resto de los genes presentes en los dos operones aguas abajo, se activan tanto en presencia de apigenina como de estrés salino, lo que indica que los genes *nod* de CIAT 899 se activan en ambas condiciones (**Tabla 52**). Para entender por qué esta bacteria porta tres copias del gen *nodA*, se llevaron a cabo mutagénesis dirigidas por delección no polar obteniéndose mutantes simples, dobles y triples que incluyen todas las combinaciones posibles. Sorprendentemente, en presencia de apigenina y estrés salino todos los mutantes seguían produciendo FN, excepto el triple mutante  $\Delta nodA1A2A3$  y el doble mutante  $\Delta nodA1A3$ , aunque este último aún producía una banda en la TLC en presencia de estrés salino. Los estudios transcriptómicos han demostrado que el gen *nodA2* se activa en presencia de apigenina. Sin embargo, cuando la bacteria solo porta una copia funcional del gen *nodA2* (mutante  $\Delta nodA1A3$ ) es incapaz de sintetizar FN en esta condición, cosa que sí hace en presencia de estrés salino. Si bien los ensayos de TLC son muy prácticos para detectar de forma rápida

la producción de FN por una estirpe bacteriana en una determinada condición, esta técnica tiene unos límites de detección bajos frente a los altos límites de detección que presentan el análisis de FN mediante espectrometría de masas. Así, mediante estos análisis, se observó la presencia de un mayor número de FN en condiciones de estrés salino (10) con respecto a apigenina (7) en el mutante  $\Delta nodA1A3$  (**Tablas 42 y 43**). Por último, también llamó la atención que con la sola presencia del gen *nodA3*, que carece de promotor *nod* y no es inducible por flavonoides, es suficiente para inducir la biosíntesis de FN en *R. tropici* CIAT 899, tanto en presencia de apigenina como de estrés salino, lo que asegura la nodulación con las cuatro plantas ensayadas.

La razón por la que NodA2 por sí solo no puede sintetizar FN en condiciones de inducción por apigenina podría deberse a que esta enzima no se ajusta eficientemente a la “cadena de montaje” del esqueleto FN de CIAT 899 por NodC y por NodB, lo que podría explicarse con el origen evolutivo de cada una de las copias de *nodA* de este rizobio, ya que el operón al que pertenece *nodA2* (*nodA2hsnTnodFE*) no parece seguir el formato típico de operones de los rizobios como ocurre con el otro operón *nodA1BCSUIJHPQ*. Por tanto, quizás los genes *nodA2hsnTnodFE* están presentes en el plásmido simbiótico de CIAT 899 por eventos de transferencia horizontal. Mientras tanto, el gen *nodA3* que se encuentra aislado en el genoma, podría haberse originado por eventos de duplicación de alguno de los otros dos *nodA*.

Además, la presencia de tres copias del gen *nodA* podría suponer una adaptación evolutiva ya que otros rizobios también tienen este número de genes *nodA* en su genoma. Un ejemplo es la estirpe *R. gallicum* IE4872, que pertenece al simbiovar *tropici* y que ha sido secuenciada recientemente, donde se ha observado la presencia de tres copias del gen *nodA* en su genoma (Bustos *et al.* 2017). Lo mismo ocurre en otras estirpes filogenéticamente próximas a CIAT 899 como son *R. freirei* PRF 81 y *R. leucaneae* CFN299, cuyos plásmidos simbióticos son idénticos a los de *R. tropici* CIAT 899 (Ormeño-Orrillo *et al.* 2012, 2016). De hecho, en estas estirpes, a diferencia del resto del genoma bacteriano, el plásmido simbiótico está muy conservado, lo que sugiere que poseer este plásmido simbiótico podría otorgar al rizobio ciertas ventajas



que han favorecido evolutivamente a aquellos rizobios que lo portan, o que lo han incorporado a su genoma por transferencia horizontal (Martínez-Romero *et al.*, 2009).

No obstante, para entender la función en simbiosis de cada uno de los genes *nodA* de CIAT 899, los ensayos de nodulación son indispensables tal y como se comenta en el siguiente apartado.

## Las dos vías de síntesis de FN en *R. tropici* CIAT 899 son relevantes para el establecimiento de la simbiosis con leguminosas

Para comprender por qué en el genoma de este rizobio hay hasta cinco copias del gen *nodD* y tres del gen *nodA*, hecho poco frecuente entre los rizobios, es importante estudiar el fenotipo simbiótico que presentan los diferentes mutantes en dichos genes. Así, en la presente Tesis Doctoral se han estudiado los fenotipos simbióticos de todos los mutantes en hasta cuatro leguminosas diferentes representativas: *P. vulgaris* (herbácea, nódulos determinados y leguminosa de interés en agricultura), *L. leucocephala* (arbórea, nódulos indeterminados), *L. japonicus* (herbácea pequeña, nódulos determinados y leguminosa modelo) y *L. burttii* (herbácea pequeña, nódulos determinados).

En primer lugar, el mutante RSP82 (mutante en el gen *nodD1*) que no produce FN en presencia de flavonoides, noduló en *P. vulgaris* y *L. burttii* (aunque con un menor NN), mientras que no lo hizo en *L. leucocephala* o *L. japonicus* (**Figura 21**) (**Tabla 39**). Por otra parte, aunque el mutante *nodD2* noduló en las cuatro leguminosas ensayadas, el doble mutante  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$ , que no produce FN en ninguna de las condiciones estudiadas, no noduló en ninguna de las leguminosas, mostrando que de las cinco copias de los genes *nodD*, *nodD1* y *nodD2* parecen ser las más relevantes en el establecimiento de la simbiosis. No es común que hasta dos proteínas NodD sean necesarias para establecer simbiosis con leguminosas. Sin embargo, esto no es la primera vez que ocurre. En algunos rizobios como en *M. loti*, que posee dos genes



*nodD*, se ha demostrado que la mutación de ambas copias abole la nodulación en *L. japonicus* (Kelly *et al.*, 2018b). Lo mismo ocurre en *S. meliloti*, donde la mutación en las tres copias del gen *nodD* bloquea la nodulación en *M. truncatula* (Honma y Ausubel, 1987).

A raíz de los resultados de los ensayos de nodulación comentados, la vía de síntesis de FN bajo estrés osmótico y regulada por NodD2, debe ser activada y por tanto relevante en la simbiosis, al menos en ciertas leguminosas como *P. vulgaris* y *L. burttii*. Esta hipótesis también se sostiene con los resultados de actividad biológica obtenidos, donde la aplicación de FN purificados en condiciones de estrés salino aumentó el número de primordios en raíces de judía con respecto al control (**Tabla 41**). Además, el número de primordios identificados cuando los FN se purificaron en el fondo mutante de *nodD2* bajo estrés salino, fue similar a los observados en las condiciones control. Por tanto, los FN que se sintetizaron bajo estrés osmótico y regulados por NodD2 tienen actividad biológica en la simbiosis. Lo mismo ocurrió con los ensayos de actividad biológica donde se aplicaron los FN purificados del mutante  $\Delta nodA1A3$  bajo estrés salino (**Tabla 45**).

Distintos autores han mostrado la existencia de diferentes puntos de elevada osmolaridad en la rizosfera, tubo de infección y simbiosoma, donde los GC juegan un papel relevante en la tolerancia a estas condiciones (Breedweld y Miller, 2012). Por lo tanto, es probable que CIAT 899 pueda inducir la síntesis de FN durante el establecimiento de la simbiosis independientemente del reconocimiento de los flavonoides, lo que le podría otorgar la capacidad extra de establecer simbiosis en determinados escenarios (**Figuras 34 y 35**). En este contexto, se ha observado que en *M. loti*, NodD1 es activado durante el tubo de infección y NodD2 en los nódulos de *L. japonicus* y, estas activaciones, son necesarias para el establecimiento de la simbiosis, lo que apunta que la síntesis de FN no solo es relevante antes de que el rizobio penetre en el pelo radical, sino que estos FN también podrían actuar en el tubo de infección y en los nódulos (Kelly *et al.*, 2018b). Además, no se ha determinado aún el flavonoide activador de las proteínas NodD1 y NodD2 de *M. loti*, lo que sugiere que otras moléculas o condiciones podrían activar estas proteínas (Kelly *et al.*, 2018b).

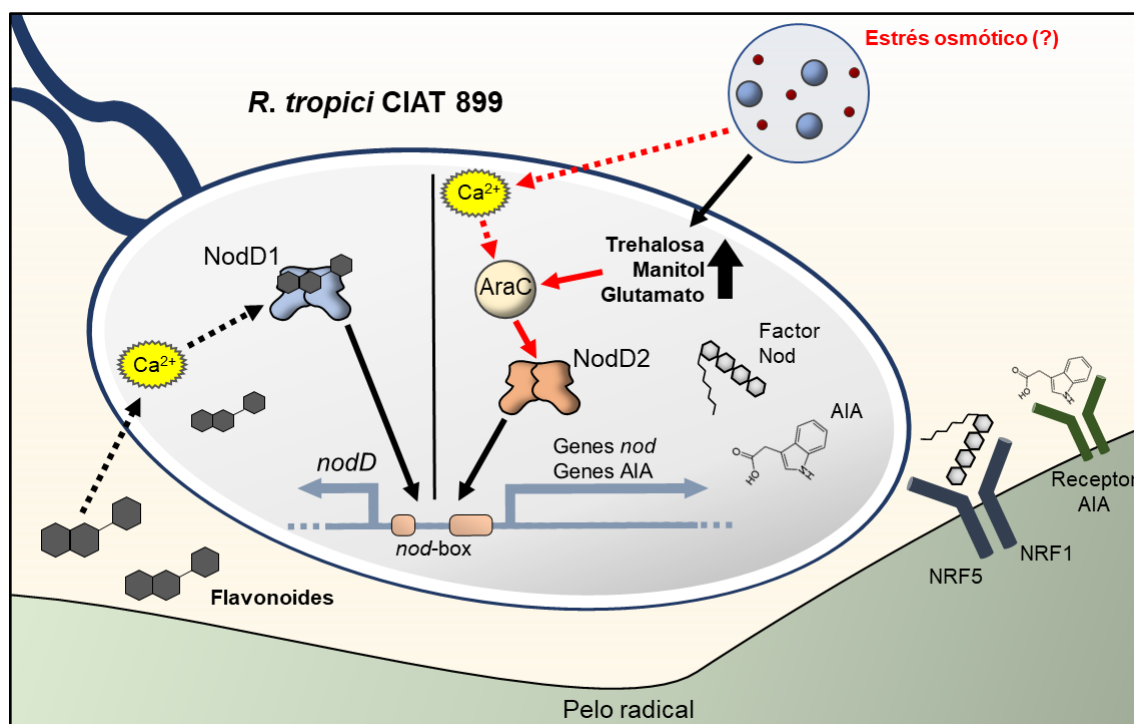


Figura 34 – Posible mecanismo de activación de los genes *nod* y los genes de síntesis de AIA en la rizosfera tanto en presencia de flavonoide como de estrés osmótico en *R. tropici* CIAT 899. Las flechas negras representan activación descrita. Las flechas rojas representan activación hipotética. Las flechas discontinuas indican que la activación podría ser directa o indirecta.

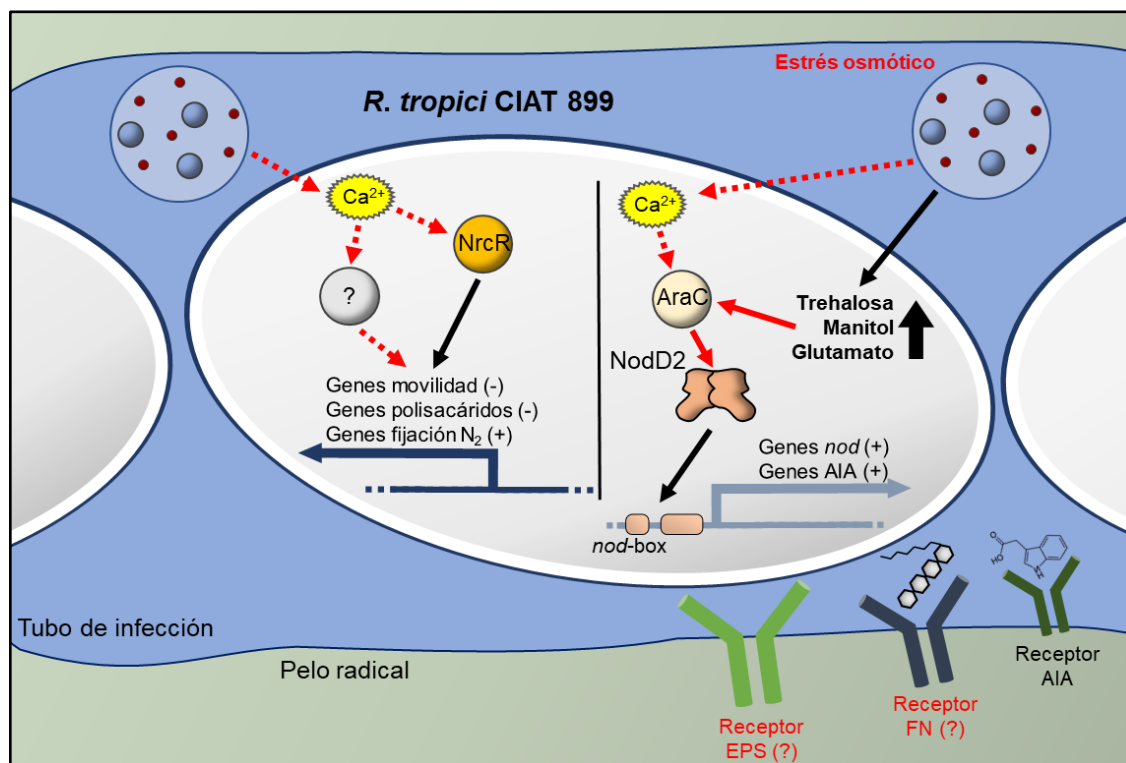


Figura 35 – Posible mecanismo de activación de los genes *nod*, síntesis de AIA y otros fenotipos en el interior del tubo de infección en *R. tropici* CIAT 899. Las flechas negras representan activación descrita. Las flechas rojas representan activación hipotética. Las flechas discontinuas indican que la activación podría ser directa o indirecta.

Otro resultado que apoya la hipótesis de que los rizobios se enfrentan a condiciones de alta osmolaridad durante la colonización de la raíz de las leguminosas se muestra en los resultados transcriptómicos obtenidos en la presente Tesis Doctoral. Concretamente, en los experimentos de ARNseq en presencia de 400 mM de manitol se ha demostrado que se activan diferencialmente hasta 18 genes relacionados con la fijación de nitrógeno, lo que sugiere que estas condiciones podrían ser similares a las que se dan en el interior de la raíz de la planta, ya que CIAT 899 no tiene la capacidad de fijar nitrógeno en vida libre (**Tabla 34**). La activación de estos genes de fijación de nitrógeno en condiciones de estrés osmótico tendría sentido fisiológico, ya que en estas condiciones que también parecen darse en el tubo de infección, la bacteria empezaría a activar estos genes porque detecta las condiciones osmóticas del interior de la planta. Además, este hecho indicaría que el estrés osmótico no-iónico por manitol se asemeja más al que hay en el interior del nódulo, ya que bajo estrés salino tan solo el gen *nifH* fue diferencialmente activado, lo que sugiere que este tipo de estrés se podría parecer más al que hay en la rizosfera o quizás en el tubo de infección. En este contexto, un estudio reciente muestra que un ARNs-trans (NfeR1) de *S. meliloti* cuya función es relevante en el establecimiento de la simbiosis con *Medicago*, presenta una expresión alta bajo estrés salino y durante la infección del rizobio, tanto en el tubo de infección como en los nódulos (Robledo *et al.*, 2017).

Aunque NodD1 y NodD2 son determinantes en la producción de FN en presencia de apigenina y estrés osmótico, respectivamente, y en la simbiosis de CIAT 899 con leguminosas, no hay que descartar el posible rol de NodD3, NodD4 y NodD5 en la nodulación con diferentes plantas leguminosas. De hecho, los mutantes en estos genes produjeron cambios en el número de FN sintetizados con respecto al silvestre (**Tabla 38**), y estos cambios podrían ser responsables de las diferencias fenotípicas observadas en los ensayos de nodulación (**Tabla 39**). Mientras que la ausencia de NodD3 y NodD5 provocó un menor NN y PSPA en *L. japonicus*, *nodD4::Ω* y *nodD5::Ω* presentaron un menor PSPA en *L. leucocephala*. Por tanto, no se debe descartar la implicación de estos reguladores de una forma u otra en la regulación de la síntesis de FN y en el establecimiento de la simbiosis efectiva con algunas leguminosas.

En cuanto a los fenotipos simbióticos en los mutantes de los genes *nodA*, todos los mutantes nodularon *P. vulgaris*, *L. leucocephala*, *L. japonicus* y *L. burtii*, excepto el triple mutante, que no noduló ninguna de las leguminosas ensayadas, y el mutante  $\Delta nodA1A3$ , que no noduló en *L. leucocephala* ni *L. burtii*, pero sí noduló las otras dos leguminosas ensayadas (**Tabla 53**) y por lo tanto mostró un fenotipo de nodulación idéntico al de la estirpe RSP82. De hecho, el mutante  $\Delta nodA1A3$  no produce FN en presencia de apigenina al igual que el mutante RSP82 (**Figuras 21 y 26**), aunque sí los produjo en condiciones de estrés salino, si bien aparentemente en menor cantidad. Por lo tanto, este fenotipo simbiótico aporta una nueva evidencia de que la vía de activación de la síntesis de FN por estrés osmótico podría tener un papel relevante en la simbiosis.

**Tabla 53 – Inducción de la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en diferentes leguminosas por *R. tropici* CIAT 899 y algunos de sus mutantes.**

Estirpe	Nodula en <i>P. vulgaris</i>	Nodula en <i>L. leucocephala</i>	Nodula en <i>L. japonicus</i>	Nodula en <i>L. burtii</i>
CIAT 899	++	++	++	++
RSP82	+	-	-	+
<i>nodD2::Ω</i>	+	++	++	++
$\Delta araC$	+	+	¿?	¿?
$\Delta nodA1A3$	++	-	-	++
$\Delta nodD1/\Delta nodD2$	-	-	-	-
$\Delta nodA1A2A3$	-	-	-	-

(++) representa alta eficiencia de nodulación, (+) baja eficiencia, (-) ausencia de nodulación y (¿?) no estudiado.

## Perspectivas de futuro

*R. tropici* CIAT 899 es capaz de establecer simbiosis con un gran número de leguminosas diferentes. En la interacción simbiótica con estas plantas, se ha descrito en la presente Tesis Doctoral dos vías de activación de los genes *nod*, una por flavonoides y regulada por NodD1, y otra por estrés osmótico y regulada por NodD2 y AraC. Esta última, aunque podría no ser común en la mayoría de los rizobios, parece intervenir en el establecimiento de la simbiosis con algunas leguminosas o en determinados escenarios. Aunque la presente Tesis representa un gran avance en este tema, muchas preguntas quedan por resolver. En primer lugar, se deben identificar nuevos elementos reguladores en estas vías y la conexión que tienen entre ellos y entre los ya existentes. Además, es muy importante conocer exactamente el momento y la forma en el que la leguminosa activa la vía de síntesis de FN bajo estrés osmótico lo que responderá a la siguiente pregunta: ¿Son los FN necesarios en cada etapa del establecimiento de la simbiosis o simplemente en el estadio temprano donde el rizobio inicia la colonización del pelo radical? Por último, es fundamental saber si este sistema está presente de una forma u otra en el resto de los rizobios, o si simplemente es una habilidad que ha surgido recientemente y que solo ciertos rizobios, como los que pertenecen al simbiovar *tropici*, poseen. Futuros trabajos ayudarán a resolver estas incógnitas.



# CONCLUSIONES

---





## Conclusiones

- 1) Los estudios transcriptómicos que se han realizado en presencia del flavonoide inductor apigenina, de estrés salino y de estrés osmótico no iónico por manitol muestran que se inducen, al menos, algunos genes de nodulación de *Rhizobium tropici* CIAT 899. Esta inducción se correlaciona con la síntesis de factores de nodulación en estas mismas condiciones.
- 2) La activación de los genes de nodulación y de la síntesis de factores de nodulación inducidas en presencia de apigenina y estrés osmótico, están regulada por las proteínas NodD1 y NodD2, respectivamente.
- 3) El mutante en el gen *nodD1* no nodula en *Leucaena leucocephala* ni en *Lotus japonicus*, pero sigue nodulando en *Phaseolus vulgaris* y *Lotus burtii*. Solo el doble mutante en los genes *nodD1* y *nodD2* deja de nodular las cuatro leguminosas ensayadas.
- 4) Aunque los genes *nodD3*, *nodD4* y *nodD5* no son esenciales en la síntesis de factores de nodulación ni en presencia de apigenina o estrés osmótico, ni son determinantes en la simbiosis con leguminosas, la ausencia de estos reguladores provoca ciertas deficiencias simbióticas. Así, mutantes afectados en los genes *nodD3* y *nodD5* inducen un menor número de nódulos en *Lotus japonicus* que la estirpe parental.
- 5) Los genes *nodA1* y *nodA2* se inducen tanto en presencia de apigenina como de estrés salino. Por su parte, el gen *nodA3* tiene una alta expresión constitutiva y por sí solo es suficiente para nodular las cuatro leguminosas ensayadas. Solo la mutación en las tres copias del gen *nodA* bloquea la síntesis de factores de nodulación tanto en presencia de apigenina y de estrés salino, e impide la nodulación en todas las leguminosas ensayadas.
- 6) El gen *nrcR* codifica para regulador transcripcional que promueve la activación de los genes *nod* en CIAT 899 tanto en presencia de apigenina como de estrés salino. Aunque este regulador no es esencial para la síntesis de factores de nodulación en CIAT 899, NrcR reprime la biosíntesis de factores con diferentes decoraciones, especialmente bajo estrés salino. Del mismo modo, la proteína NrcR reprime también la movilidad superficial y la producción de exopolisacáridos.

7) La mutación del gen *nrcR* hace que CIAT 899 sea menos competitivo que la estirpe silvestre para nodular *Phaseolus vulgaris* e induzca un menor número de nódulos y un menor peso seco de la parte aérea en *Phaseolus vulgaris* y *Leucaena leucocephala*.

8) El regulador transcripcional codificado por el gen *araC* es esencial en la activación de los genes de nodulación y en la síntesis de factores de nodulación en presencia de estrés salino. La mutación del gen *araC* hace que la bacteria induzca un menor número de nódulos y un menor peso seco de la parte aérea en *Phaseolus vulgaris* y *Leucaena leucocephala* con respecto a la estirpe silvestre.

## Conclusions

1) The transcriptomic studies made in the presence of apigenin, salt stress and non-ionic osmotic stress by manitol conditions have shown that at least several *Rhizobium tropici* CIAT 899 *nod* genes have been induced. This activation is correlated with the synthesis of Nod factors in these conditions.

2) The activation of the *nod* genes and the synthesis of Nod factors induced in the presence of apigenin and osmotic stress, are regulated by NodD1 and NodD2 proteins, respectively.

3) The *nodD1* mutant doesn't nodulate *Leucaena leucocephala* and *Lotus japonicus*, but it does in *Phaseolus vulgaris* and *Lotus burtii*. Only the double mutation in *nodD1* and *nodD2* genes abolish completely the nodulation in the four legumes tested.

4) The *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes are not essentials for the synthesis of Nod factors in the presence of apigenin or osmotic stress, nor determinants in the symbiosis with legumes. However, the absence of these proteins provokes several symbiotic deficiencies. Thus, the *nodD3* and *nodD5* mutants induce less nodule number in *Lotus japonicus* in comparison with the wild-type strain.

5) The *nodA1* and *nodA2* genes are induced in the presence of apigenin or salt stress. The *nodA3* gene presents a high constitutive expresión and it is sufficient for the establishment of symbiosis in the four legumes assayed by itself. The mutation in the three copies of the *nodA* genes block the synthesis of Nod factors in the presence of apigenin and salt stress impairing the nodulation in all the legumes assayed.

6) The *nrcR* gene encode for a transcriptional regulator which promotes the activation of the *nod* genes in CIAT 899 in the presence of apigenin and salt stress. This transcriptional regulator is not essential for the synthesis of Nod factors but it inhibits the production of these molecules with more decorations, especially under salt stress. In addition, NrcR protein also inhibits the surface motility and exopolysaccharides production.

7) The mutation of the *nrcR* turns CIAT 899 less competitive than the wild-type strain in the establishment of the symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. The *nrcR* mutant

presents less nodule number and shoot dry weight in *Phaseolus vulgaris* and *Leucaena leucocephala* in comparison with the wild-type strain.

8) The transcriptional regulator encoded by *araC* gene is essential in the activation of the *nod* genes and in the synthesis of Nod factors in presence of salt stress. The mutation in the *araC* gene makes this bacterium induce less nodule number and less shoot dry weight in *Phaseolus vulgaris* and *Leucaena leucocephala* in comparison with the wild-type strain.

# BIBLIOGRAFÍA

---



## Bibliografía

- Acosta-Jurado, S., Rodríguez-Navarro, D.N., Kawaharada, Y., Perea, J.F., Gil-Serrano, A., Jin, H., *et al.* (2016a). *Sinorhizobium fredii* HH103 invades *Lotus burtii* by crack entry in a Nod Factor-and surface polysaccharide-dependent manner. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29, 925-937.
- Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Murdoch, P.S., Crespo-Rivas, J. C., Jie, S., Cuesta-Berrio, L., *et al.* (2016b). Exopolysaccharide production by *Sinorhizobium fredii* HH103 is repressed by genistein in a NodD1-dependent manner. *PLOS ONE*, 11, e0160499.
- Acosta-Jurado, S., Rodríguez-Navarro, D.N., Kawaharada, Y., Rodríguez-Carvajal, M.A., Gil-Serrano, A., Soria-Díaz, M.E., *et al.* (2019). *Sinorhizobium fredii* HH103 *nolR* and *nodD2* mutants gain capacity for infection thread invasion of *Lotus japonicus* Gifu and *Lotus burtii*. *Environmental Microbiology* (Aceptado para su publicación. doi: 10.1111/1462-2920-14584).
- Amaya-Gómez, C. V., Hirsch, A.M., & Soto, M.J. (2015). Biofilm formation assessment in *Sinorhizobium meliloti* reveals interlinked control with surface motility. *BMC Microbiology*, 15, 390.
- Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 11, R106.
- Atkinson, E. M., Palcic, M. M., Hindsgaul, O., & Long, S. R. (1994). Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide Nod factors: NodA is required for an N-acyltransferase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 8418-8422.
- Beringer, J.E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 84, 188-198
- Boboye, B. (2004). Degradation of trehalose by rhizobia and characteristics of a trehalose-degrading enzyme isolated from *Rhizobium* species NGR234. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 256-261.

Breedveld, M.W., & Miller, K.J. (1998). Cell-Surface  $\beta$ -Glucans. En: *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P., eds. Springer Netherlands. pp. 81-96. ISBN: 9780792351801.

Bric, J., Bostock, R.M., & Silverstone, S.E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 535-538.

Broghammer, A., Krusell, L., Blaise, M., Sauer, J., Sullivan, J. T., Maolanon, N., *et al.* (2012). Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109, 13859-13864.

Broughton, W.J., Jabbouri, S., & Perret, X. (2000). Keys to symbiotic harmony. *Journal of Bacteriology*, 182, 5641-5652.

Buendía-Clavería, A.M., Ruiz-Sainz, J.E., Cubo-Sánchez, T., & Pérez-Silva, J. (1986). Studies of symbiotic plasmids in *Rhizobium trifolii* and fast-growing bacteria that nodulate soybeans. *Journal of Applied Bacteriology*, 61, 1-9.

Buendía-Clavería, A.M., Moussaid, A., Ollero, F.J., Vinardell, J.M., Torres, A., Moreno, J., *et al.* (2003). A *purL* mutant of *Sinorhizobium fredii* HH103 is symbiotically defective and altered in its lipopolysaccharide. *Microbiology-SGM*, 149, 1807-1818.

Bustos, P., Santamaría, R. I., Pérez-Carrascal, O.M., Acosta, J.L., Lozano, L., Juárez, S., *et al.* (2017). Complete genome sequences of three *Rhizobium gallicum* symbionts associated with common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Genome Announcements*, 5, e00030-17.

Cabello, P., Roldán M.D., Castillo, F., & Moreno-Vivián, C. (2009). Nitrogen Cycle. (Chapter 55). En: *Encyclopedia of Microbiology* 3rd ed. (M. Schaechter ed.), Elsevier, Oxford. pp. 299-321. ISBN: 9780123739445.

Calatrava-Morales, N., McIntosh, M., & Soto, M. (2018). Regulation mediated by N-acyl homoserine lactone quorum sensing signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Genes*, 9, 263.



- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaw, P.D., & Farrand, S.K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant associated bacteria. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 11, 1119-1129.
- Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E., & Parniske, M. (2008). *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *The Plant Cell*, 20, 3467-3479.
- Charpentier, M., Sun, J., Martins, T. V., Radhakrishnan, G.V., Findlay, K., Soumpourou, E., *et al.* (2016). Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science*, 352, 1102-1105.
- Cook, D.E., Mesarich, C.H., & Thomma, B.P. (2015). Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 541-563.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., & Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilm. *Annual Review of Microbiology*, 49, 711-745.
- Cren, M., Kondorosi, A., & Kondorosi, E. (1995). NodR controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factor synthesis. *Molecular Microbiology*, 15, 733-747.
- Crespo-Rivas, J.C., Margaret, I., Hidalgo, A., Buendia-Claveria, A.M., Ollero, F.J., López-Baena, F.J., *et al.* (2009). *Sinorhizobium fredii* HH103 cgs mutants are unable to nodulate determinate-and indeterminate nodule-forming legumes and overproduce an altered EPS. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 22, 575-588.
- Dardanelli, M.S., Fernández de Córdoba, F.J., Espuny, M.R., Rodríguez-Carvajal, M.A., Soria Díaz, M.E., Gil-Serrano, A.M., Okon, Y., & Megías, M. (2008). Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biology and Biochemistry*. 40, 2713-2721.
- Deakin, W.J., & Broughton, W.J. (2009). Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 312-320.

- de Maagd, R.A., Wijffelman, C.A., Pees, E., & Lugtenberg, B.J.J. (1988). Detection and subcellular localization of two Sym plasmid-dependent proteins of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Journal of Bacteriology*, 170, 4424-4427.
- del Cerro, P., Rolla-Santos, A.A.P., Gomes, D.F., Marks, B.B., Pérez-Montaña, F., Rodríguez-Carvajal, M.A., et al. (2015a). Regulatory *nodD1* and *nodD2* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 and their roles in the early stages of molecular signaling and host-legume nodulation. *BMC Genomics*, 16, 251.
- del Cerro, P., Rolla-Santos, A.A.P., Gomes, D.F., Marks, B.B., Espuny, M.R., Rodríguez-Carvajal, M.A., et al. (2015b). Opening the “black box” of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899. *BMC Genomics*, 16, 864.
- del Cerro, P., Rolla-Santos, A.A., Valderrama-Fernández, R., Gil-Serrano, A., Bellogín, R.A., Gomes, D.F., et al. (2016). NrcR, a new transcriptional regulator of *Rhizobium tropici* CIAT 899 involved in the legume root-nodule symbiosis. *PLOS ONE*, 11, e0154029.
- del Cerro, P., Pérez-Montaña, F., Gil-Serrano, A., López-Baena, F.J., Megías, M., Hungria, M., & Ollero, F.J. (2017). The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. *Scientific Reports*, 7, 46712.
- del Cerro, P., Megías, M., López-Baena, F.J., Gil-Serrano, A., Pérez-Montaña, F., & Ollero, F.J. (2019). Osmotic stress activates *nif* and *fix* genes and induces the *Rhizobium tropici* CIAT 899 Nod factor production via NodD2 by up-regulation of the *nodA2* operon and the *nodA3* gene. *PLOS ONE*, 14, e0213298.
- Dénarié, J., Debelle, F., & Prome, J.C. (1996). *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 503-535.
- Döbereiner, J., Marriel, I.E., & Nery, M. (1976). Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology*, 22, 1464-1473.
- Downie, J.A. (1998). Functions of rhizobial nodulation genes. En: *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P., eds. Springer Netherlands. pp. 387-402. ISBN: 9780792351801.

- Downie, J.A. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 150-170.
- Estévez, J., Soria-Díaz, M. E., De Córdoba, F. F., Morón, B., Manyani, H., Gil, A., *et al.* (2009). Different and new Nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899 following Na<sup>+</sup> stress. *FEMS Microbiology Letters*, 293, 220-231.
- Estupinan-Silva, R., & Quesada, B. (2011). El Proceso Haber-Bosch En: La Sociedad Agroindustrial: Peligros y Alternativas. *Instituto Latinoamericano para una Sociedad y un Derecho Alternativos-Revista El Otro Derecho*, 42, 75-96.
- Fagotti, D.S.L., Abrantes, J.L.F., Cerezini, P., Fukami, J., Nogueira, M.A., del Cerro, P., *et al.* M. (2019). Quorum sensing communication: *Bradyrhizobium-Azospirillum* interaction via N-acyl-homoserine lactones in the promotion of soybean symbiosis. *Journal of Basic Microbiology*, 59, 38-53.
- Fauvart, M., & Michiels, J. (2008). Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. *FEMS Microbiology Letters*, 285, 1-9.
- Fellay, R., Hanin, M., Montorzi, G., Frey, J., Freiberg, C., Golinowski, W., *et al.* (1998). *nodD2* of *Rhizobium* sp. NGR234 is involved in the repression of the *nodABC* operon. *Molecular Microbiology*, 27, 1039-1050.
- Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E., & Gresshoff, P.M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, 61-76.
- Ferguson, B.J., & Mathesius, U. (2014). Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 40, 770-790.
- Fernández-Aunión, C., Hamouda, T.B., Iglesias-Guerra, F., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Nieto, J.J., *et al.* (2010). Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. *BMC Microbiology*, 10, 192.
- Figurski, D.H., & Helinski, D.R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76, 1648-1652.

- Fournier, J., Timmers, A.C., Sieberer, B.J., Jauneau, A., Chabaud, M., & Barker, D.G. (2008). Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiology*, 148, 1985-1995.
- Fujishige, N.A., Lum, M.R., De Hoff, P.L., Whitelegge, J.P., Faull, K.F., & Hirsch A.M. (2006). Rhizobium common nod genes are required for biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 67, 504-515.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., & Greenberg, E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176, 269-275.
- Gallegos, M.T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., & Ramos, J.L. (1997). Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 393-410.
- Gamas, P., Brault, M., Jardinaud, M.F., & Frugier, F. (2017). Cytokinins in symbiotic nodulation: when, where, what for? *Trends in Plant Science*, 22, 792-802.
- Geremia, R.A., Mergaert, P., Geelen, D., Van Montagu, M., & Holsters, M. (1994). The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 2669-2673.
- Gibson, K.E., Kobayashi, H., & Walker, G.C. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics*, 42, 413-441.
- Gilbert, P., Das, J., & Foley, I. (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Advances in Dental Research*, 11, 160-167.
- Graham, P.H., Draeger, K.J., Ferrey, M.L., Conroy, M.J., Hammer, B.E., Martínez, E., et al. (1994). Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology*, 40, 198-207.
- Green, R.T., East, A.K., Karunakaran, R., Downie, J.A., & Poole, P.S. (2019). Transcriptomic analysis of *Rhizobium leguminosarum* bacteroids in determinate and indeterminate nodules. *Microbial Genomics*, 5, e000254.

- Griffitts, J.S., & Long, S.R. (2008). A symbiotic mutant of *Sinorhizobium meliloti* reveals a novel genetic pathway involving succinoglycan biosynthetic functions. *Molecular Microbiology*, 67, 1292-1306.
- Guasch-Vidal, B., Estévez, J., Dardanelli, M.S., Soria-Díaz, M.E., de Córdoba, F.F., Balog, C.I.A., *et al.* (2013). High NaCl concentrations induce the *nod* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899 in the absence of flavonoid inducers. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 26, 451-460.
- Honma, M.A., & Ausubel, F.M. (1987). *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the *nodD* symbiotic regulatory gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84, 8558-8562.
- Hungria, M., Franco, A.A., & Sprent, J.I. (1993). New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, 149, 103-109.
- Hungria, M., Andrade, D.S., Chueire, L.M.O., Probanza, A., Gutiérrez-Mañero, F.J., & Megías, M. (2000). Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1515-1528.
- Hungria, M., Campo, R. J., & Mendes, I.C. (2003). Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biology and Fertility of Soils*, 39, 88-93.
- Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M., & Pedrosa, F.O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331, 413-425.
- Jameson, P.E. (2000). Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions: An overview. *Plant Growth Regulation*, 32, 369-380.
- Janczarek, M. (2011). Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 7898-7933.
- Janczarek, M., Rachwał, K., Marzec, A., Grządziel, J., & Palusińska-Szys, M. (2015). Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume-rhizobium interactions. *Applied Soil Ecology*, 85, 94-113.

- Jiménez-Guerrero, I., Pérez-Montaña, F., Monreal, J.A., Preston, G.M., Fones, H., Vioque, B., *et al.* (2015). The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 type 3 secretion system suppresses early defense responses to effectively nodulate soybean. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 28, 790-799.
- John, M., Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., & Schell, J. (1993). *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90, 625-629.
- Kaló, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R. M., Hirsch, S., *et al.* (2005). Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science*, 308, 1786-1789.
- Kawaguchi, M., Pedrosa-Harand, A., Yano, K., Hayashi, M., Murooka, Y., Saito, K., *et al.* (2005). *Lotus burtii* takes a position of the third corner in the *Lotus* molecular genetics triangle. *DNA Research*, 12, 69-77.
- Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M. W., Hjuler, C. T., Gysel, K., Muszyński, A., *et al.* & (2015). Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature*, 523, 308-312.
- Kearns, D.B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 634-644.
- Kelly, S., Mun, T., Stougaard, J., Ben, C., & Andersen, S.U. (2018a). Distinct *Lotus japonicus* transcriptomic responses to a spectrum of bacteria ranging from symbiotic to pathogenic. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1218.
- Kelly, S., Sullivan, J.T., Kawaharada, Y., Radutoiu, S., Ronson, C.W., & Stougaard, J. (2018b). Regulation of Nod factor biosynthesis by alternative NodD proteins at distinct stages of symbiosis provides additional compatibility scrutiny. *Environmental Microbiology*, 20, 97-110.
- Kereszt, A., Mergaert, P., Montiel, J., Endre, G., & Kondorosi, E. (2018). Impact of plant peptides on symbiotic nodule development and functioning. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1026.

- Khlebnikov, A., Risa, Ø., Skaug, T., Carrier, T.A., & Keasling, J.D. (2000). Regulatable arabinose-inducible gene expression system with consistent control in all cells of a culture. *Journal of Bacteriology*, 182, 7029-7034.
- Kiss, E., Mergaert, P., Oláh, B., Kereszt, A., Staehelin, C., Davies, A.E., *et al.* (1998). Conservation of *nolR* in the *Sinorhizobium* and *Rhizobium* genera of the *Rhizobiaceae* family. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 11, 1186-1195.
- Kittelberger, R., & Hilbink, F. (1993). Sensitive silver-staining detection of bacterial lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Journal Biochemical and Biophysical Methods*, 26, 81-86.
- Kobayashi, H., Graven, Y. N., Broughton, W.J., & Perret, X. (2004). Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod*-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. *Molecular Microbiology*, 51, 335-347.
- Kondorosi, E., Gyuris, J., Schmidt, J., John, M., Duda, E., Hoffmann, B., *et al.* (1989). Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO Journal*, 8, 1331-1340.
- Kondorosi, E., Pierre, M., Cren, M., Haumann, U., Buire, M., Hoffmann, B., *et al.* (1991). Identification of *NolR*, a negative transacting factor controlling the *nod* regulon in *Rhizobium meliloti*. *Journal of Molecular Biology*, 222, 885-896.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., & Peterson, K.M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166, 175-176.
- Laeremans, T., & Vanderleyden, J. (1998). Infection and nodulation signalling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 787-808.
- Lee, S.G., Krishnan, H.B., & Jez, J.M. (2014). Structural basis for regulation of rhizobial nodulation and symbiosis gene expression by the regulatory protein *NolR*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 111, 6509-6514.
- Long, S.R. (2016). SnapShot: Signaling in Symbiosis. *Cell*. 167, 582-582.



- López-Baena, F.J., Vinardell, J.M., Pérez Montañó, F., Crespo-Rivas, J.C., Bellogín, R.A., Espuny, M. R., & Ollero, F.J. (2008). Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. *Microbiology-SGM*, 154, 1825-1836.
- López-Baena, F.J., Ruiz-Sainz, J.E., Rodríguez-Carvajal, M.A., & Vinardell, J.M. (2016). Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-soybean symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, E755.
- Lowden, M.J., Skorupski, K., Pellegrini, M., Chiorazzo, M.G., Taylor, R.K., & Kull, F.J. (2010). Structure of *Vibrio cholerae* ToxT reveals a mechanism for fatty acid regulation of virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107, 2860-2865.
- Machado, D., Pueppke, S.G., Vinardel, J.M., Ruiz-Sainz, J.E., & Krishnan, H.B. (1998). Expression of *nodD1* and *nodD2* in *Sinorhizobium fredii*, a nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 11, 375-382.
- Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczygłowski, K., et al. Stougaard, J. (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, 425, 637-640.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., & Sambrook, J. (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. ISBN: 0879691360.
- Madsen, L.H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B., Bek, A. S., et al. (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nature Communications*, 1, 10.
- Margaret-Oliver, I., Lei, W., Parada, M., Rodríguez-Carvajal, M.A., Crespo-Rivas, J.C., Hidalgo, A. et al. (2012). *Sinorhizobium fredii* HH103 does not strictly require KPS and/or EPS to nodulate *Glycyrrhiza uralensis*, an indeterminate nodule-forming legume. *Archives of Microbiology*, 194, 87-102.
- Margaret, I., Lucas, M., Acosta-Jurado, S., Buendía-Clavería, A.M., Fedorova, E., Hidalgo, A., et al. (2013). The *Sinorhizobium fredii* HH103 lipopolysaccharide is not only relevant at early soybean nodulation stages but also for symbiosome stability in mature nodules. *PLOS ONE*, 8: e74717.



- Martin, R.G., & Rosner, J.L. (2001). The AraC transcriptional activators. *Current Opinion in Microbiology*, 4, 132-137.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A.A., Graham, P., & Pardo, M.A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41, 417-426.
- Martinez-Romero, E. (2003). Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil*, 252, 11-23.
- Martínez-Romero, E. (2009). Coevolution in *Rhizobium*-legume symbiosis? *DNA Cell Biology*, 28, 361-370.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut, J. (2009). Establishing nitrogen fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? *Trends in Microbiology*, 17, 458- 466.
- Mergaert, P., van Montagu, P. & Holster, M. (1997). Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Molecular Microbiology*, 25, 811-817.
- Miller, J.H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. ISBN: 0879691069.
- Miller, M.B., & Bassler, B.L., (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annual Review Microbiology*, 55, 165-199.
- Miller, J.B., Pratap, A., Miyahara, A., Zhou, L., Bornemann, S., Morris, R. J., & Oldroyd, G.E. (2013). Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase is negatively and positively regulated by calcium, providing a mechanism for decoding calcium responses during symbiosis signaling. *The Plant Cell*, 25, 5053-5066.
- Moscatiello, R., Squartini, A., Mariani, P. & Navazio, L. (2010). Flavonoid-induced calcium signalling in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *New Phytology*, 188, 814-823.
- Müller, D.B., Vogel, C., Bai, Y. & Vorholt, J.A. (2016). The plant microbiota: systems-level insights and perspectives. *Annual Review of Genetics*, 50, 211-234.

- Mulligan, J.T., & Long, S.R. (1985). Induction of *Rhizobium meliloti nodC* expression by plant exudate requires *nodD*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 82, 6609-6613.
- Nelson, M.S., & Sadowsky, M.J. (2015). Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Frontiers in Plant Science*, 6, 491.
- Oldroyd, G., & Downie, A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 519-546.
- Oldroyd, G., Murray, J., Poole, P.S., & Downie, J.A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45, 119-144.
- Oldroyd, G.E. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 252-263.
- Ormeño-Orrillo, E., Menna, P., Almeida, L.G.P., Ollero, F.J., Nicolás, M.F., Rodrigues, E.P., *et al.* (2012). Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics*, 13, 735.
- Ormeño-Orrillo, E., Gomes, D.F., del Cerro, P., Vasconcelos, A.T.R., Canchaya, C., Almeida, L.G.P., *et al.* (2016). Genome of *Rhizobium leucaenae* strains CFN 299 T and CPAO 29.8: searching for genes related to a successful symbiotic performance under stressful conditions. *BMC Genomics*, 17, 534.
- Osman, D., & Cavet, J.S. (2010). Bacterial metal-sensing proteins exemplified by ArsR-SmtB family repressors. *Natural Product Reports*, 27, 668-680.
- Parada, M., Vinardell, J.M., Ollero, F.J., Hidalgo A, Gutiérrez, R., Buendía-Clavería, A.M., *et al.* (2006). *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 19, 43-52.
- Patten, C.L., & Glick, B.R. (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3795-3801.

Peck M.C., Fisher R.F., & Long S.R. (2006). Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 188, 5417-5427.

Peck, M.C., Fisher, R.F., Bliss, R., & Long, S.R. (2013). Isolation and characterization of mutant *Sinorhizobium meliloti* NodD1 proteins with altered responses to luteolin. *Journal of Bacteriology*, 195, 3714-3723.

Pérez-Montaña, F., Guasch-Vidal, B., González-Barroso, B., López-Baena, F.J., Cubo, T., Ollero, F.J., *et al.* (2011). Nodulation-gene-inducing flavonoids increase overall production of autoinducers and expression of N-acyl homoserine lactone synthesis genes in rhizobia. *Research in Microbiology*, 162, 715-723.

Pérez-Montaña, F., Jiménez-Guerrero, I., Contreras Sánchez-Matamoros, S., López-Baena, F.J., Ollero, F.J., Rodríguez-Carvajal, M.A., Bellogín, R.A., & Espuny, M.R. (2013) Rice and bean AHL-mimic quorum-sensing signals specifically interfere with the capacity to form biofilms by plant-associated bacteria. *Research in Microbiology*, 164, 749-760.

Pérez-Montaña, F., Jiménez-Guerrero, I., del Cerro, P., Baena-Ropero, I., López-Baena, F.J., Ollero, F.J., *et al.* (2014). The symbiotic biofilm of *Sinorhizobium fredii* SMH12, necessary for successful colonization and symbiosis of *Glycine max* cv Osumi, is regulated by Quorum Sensing systems and inducing flavonoids via NodD1. *PLOS ONE*, 9, e105901.

Pérez-Montaña, F., del Cerro, P., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F.J., Cubo, M.T., Hungria, M., Megías, M., & Ollero, F.J. (2016a). RNA-seq analysis of the *Rhizobium tropici* CIAT 899 transcriptome shows similarities in the activation patterns of symbiotic genes in the presence of apigenin and salt. *BMC Genomics*, 17, 198.

Pérez-Montaña, F., Jiménez-Guerrero, I., Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Ollero, F. J., Ruiz-Sainz, J. E., López-Baena, F.J., & Vinardell, J.M. (2016b). A transcriptomic analysis of the effect of genistein on *Sinorhizobium fredii* HH103 reveals novel rhizobial genes putatively involved in symbiosis. *Scientific Reports*, 6, 31592.

Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W.J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 180-201.

- Peters, J.W., & Szilagyi, R.K. (2006). Exploring new frontiers of nitrogenase structure and mechanism. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10, 101-108.
- Prentki, P., & Krisch, H.M. (1984). *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*, 29, 303-313.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, e36.
- Prinsen, E., Chauvaux, N., Schmidt, J., John, M., Wieneke, U., De Greef, J., & Van Onckelen, H. (1991). Stimulation of indole-3-acetic acid production in *Rhizobium* by flavonoids. *FEBS Letters*, 282, 53-55.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., & Grønlund, M., *et al.* (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 425, 585-592.
- Remigi, P., Zhu, J., Young, J.P.W., & Masson-Boivin, C. (2015) Symbiosis within symbiosis: evolving nitrogen-fixing legume symbionts. *Trends in Microbiology*, 24, 63-75.
- Ribeiro, R.A., Rogel, M.A., López-López, A., Ormeño-Orrillo, E., Barcellos, F.G., Martínez J, *et al.* (2012). Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 1180-1185.
- Rinaudi, L.V. & Giordano, W. (2010). An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiology Letters*, 30, 1-11.
- Roberson, J.G., & Lyttleton, P. (1984). Division of peribacteroid membranes in root nodules of white clover. *Journal of Cell Science*, 69, 147-157.
- Robledo, M., Peregrina, A., Millán, V., García-Tomsig, N.I., Torres-Quesada, O., Mateos, P.F., *et al.* (2017). A conserved  $\alpha$ -proteobacterial small RNA contributes to osmoadaptation and symbiotic efficiency of rhizobia on legume roots. *Environmental Microbiology*, 19, 2661-2680.

- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., & Smyth, G.K. (2010). EdgeR a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26, 139-140.
- Saiki, R.K. (1990). Amplification of genomic DNA. En: PCR Protocols. A guide of methods and applications. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., eds. Academic Press Inc., (EEUU). pp. 13-20. ISBN: 9780123721815.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Nueva York (EEUU). ISBN: 0879693096.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., *et al.* (2008). Genome structure of the legume *Lotus japonicus*. *DNA Research*, 15, 227-239.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., & Puhler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 145, 69-73.
- Shi, W., Wu, J., & Rosen, B.P. (1994). Identification of a putative metal binding site in a new family of metalloregulatory proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 19826-19829.
- Singh, S., & Parniske, M. (2012). Activation of calcium-and calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK), the central regulator of plant root endosymbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 444-453.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debellé, F., Gough, C., Bisseling, T., & Geurts, R. (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science*, 308, 1789-1791.
- Spaink, H.P., Sheeley, D.M., van Brussel, A.A.N., Glushka, J., York, W.S., Tak, T., *et al.* (1991). A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature*, 354, 125-130.
- Spaink, H.P. (1992). Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and questions. *Plant Molecular Biology*, 20, 977-986.

Spaink, H.P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54, 257-288.

Sprent, J.I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytology*, 174, 11-25.

Stanley, N.R., & Lazazzera, B.A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 52, 917-924.

Sugawara, M., & Sadowsky, M.J. (2014). Enhanced nodulation and nodule development by *nolR* mutants of *Sinorhizobium medicae* on specific *Medicago* host genotypes. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 27, 328-335.

Sutherland, I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3-9.

Theunis, M., Kobayashi, H., Broughton, W.J., & Prinsen, E. (2004). Flavonoids, NodD1, NodD2, and *nod*-box NB15 modulate expression of the *y4wEFG* locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, 1153-1161.

Tomlinson, A.D., Ramey-Hartung, B., Day, T.V., Merrit, P.M., & Fuqua, C. (2010). *Agrobacterium tumefaciens* ExoR represses succinoglycan biosynthesis and is required for biofilm formation and motility. *Microbiology-SGM*, 156, 2670-2681.

Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., *et al.* (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28, 511-515.

Truchet, G., Camut, S., de Billy, F., Odorico, R. & Vasse, J. (1989). The *Rhizobium*-legume symbiosis. Two methods to discriminate between nodules and other root derived structures. *Protoplasma*, 149, 82-89.

Tseng, T.T., Tyler, B.M., & Setubal, J.C. (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the gene ontology. *BMC Microbiology*, 9, S2.

Tullio, L.D., Nakatani, A.S., Gomes, D.F., Ollero, F.J., Megías, M., & Hungria, M. (2019). Revealing the roles of *y4wF* and *tidC* genes in *Rhizobium tropici* CIAT 899:

biosynthesis of indolic compounds and impact on symbiotic properties. *Archives of Microbiology*, 201, 171-183.

Turner, G.L., & Gibson, A.H. (1980). Measurements of nitrogen fixation by indirect means. En: *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Bergensen, F.J., ed. John Wiley and sons. Chichester, New York, USA. pp. 111-133. ISBN: 0471277592.

Udvardi, M., & Poole, P.S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 781-805.

Vance, C.P. (2002). Root-bacteria interactions: symbiotic nitrogen fixation. En: *Plant roots: The Hidden Half*. Waisel, Y., Eshel, A., Kafkati, U., eds. Marcel Dekker Publishers, New York. pp. 839-867. ISBN: 0824706315.

van Brussel, A.A.N., Planque, K., & Quispel, A. (1977). The wall of *Rhizobium leguminosarum* in bacteroid and free-living forms. *Journal of General Microbiology*, 101, 51-56.

Van Rhijn, P., Desair, J., Vlassak, K., & Vanderleyden, J. (1994). Functional analysis of *nodD* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 7, 666-677.

Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., & Michiels, J. (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 16, 496-506.

Vinardell, J.M., Ollero, F.J., Hidalgo, A., López-Baena, F.J., Medina, C., Ivanov-Vangelov, K., *et al.* (2004a). NodR regulates diverse symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17, 676-685.

Vinardell, J.M., López-Baena, F.J., Hidalgo, A., Ollero, F.J., Bellogín, R.A., Espuny, M.R. *et al.* (2004b). The effect of FITA mutations on the symbiotic properties of *Sinorhizobium fredii* varies in a chromosomal-background-dependent manner. *Archives of Microbiology*, 181, 144-154.

Vinardell, J.M., Ollero, F.J., López-Baena, F.J., Gil-Serrano, A.M., & Ruiz-Sainz, J.E. (2005). Symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* and other related sinorhizobia. En: *Recent Research Developments in Genes & Genomes*, vol 1. Pandalai, S.G., ed. Transworld Research Network. Kerala, India. pp. 131-156. ISBN: 8178951665.



- Vincent, J.M. (1970). The modified Fåhræus slide technique. En: A manual for the practical study of root nodule bacteria. Vincent, J.M., ed. Blackwell Scientific. Oxford, UK. pp 144-145. ISBN: 0632064102.
- Wang, E.T., Martínez-Romero, J., & Martínez-Romero, E. (1999). Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils. *Molecular Ecology*, 8, 711-724.
- Wassem, R., Marin, A. M., Daddaoua, A., Monteiro, R. A., Chubatsu, L.S., Ramos, J.L., *et al.* (2017). A Nod D-like protein activates transcription of genes involved with naringenin degradation in a flavonoid-dependent manner in *Herbaspirillum seropedicae*. *Environmental Microbiology*, 19, 1030-1040.
- Weir, B.S. (2016). The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>.
- Whitehead, L.F. & Day, D.A. (1997). The peribacteroid membrane. *Physiologia Plantarum*, 100, 30-44.
- Yang, J., Dogovski, C., Hocking, D., Tauschek, M., Perugini, M., & Robins-Browne, R.M. (2009). Bicarbonate-mediated stimulation of RegA, the global virulence regulator from *Citrobacter rodentium*. *Journal of Molecular Biology*, 394, 591-599.
- Yang, J., Tauschek, M., & Robins-Browne, R.M. (2011). Control of bacterial virulence by AraC-like regulators that respond to chemical signals. *Trends in Microbiology*, 19, 128-135.
- Yano, K., Yoshida, S., Müller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., *et al.* (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105, 20540-20545.
- Yeh, K.C., Peck, M.C., & Long, S.R. (2002). Luteolin and GroESL modulate in vitro activity of NodD. *Journal of Bacteriology*, 184, 525-530.



## ANEXOS

---



## Anexos

Anexo 1 – FN producidos por *R. tropici* CIAT 899 y sus estirpes derivadas en condiciones control.

Estructura	CIAT 899	<i>nodD1::Ω</i>	<i>nodD2::Ω</i>	<i>nodD3::Ω</i>	<i>nodD4::Ω</i>	<i>nodD5::Ω</i>	<i>nrcR::Ω</i>
III (C <sub>14:0</sub> , NMe)	-	-	-	-	+	-	-
III (C <sub>16:0</sub> )	-	-	-	-	+	-	+
III (C <sub>16:0</sub> , NMe)	-	-	-	-	+	-	+
III (C <sub>18:1</sub> )	+	+	-	-	-	-	+
III (C <sub>18:0</sub> )	-	-	-	-	+	-	-
III (C <sub>18:1</sub> , NMe)	-	-	-	-	+	-	+
IV (C <sub>16:0</sub> )	+	+	+	-	+	+	+
IV (C <sub>16:1</sub> )	-	-	-	-	+	-	-
IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)	-	-	+	-	+	+	+
IV (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+	+	+	+	+
IV (C <sub>18:0</sub> )	+	-	-	-	-	-	-
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+	+	-	+	-	+
V (C <sub>14:0</sub> , NMe)	+	-	+	-	-	-	-
V (C <sub>16:0</sub> )	+	+	+	-	+	+	-
V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+	+	-	+	+	+
V (C <sub>18:0</sub> , S)	-	-	-	-	-	+	+
V (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+	+	+	+	+
V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+	+	-	+	+	+
V (C <sub>18:1</sub> , S)	-	-	-	-	-	-	+
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	+	+	+	-	+	-	+
V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	-	+	-	-	-	-	+
V (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)	-	+	-	-	-	-	-

(+) indica FN detectados y (-) no detectados. El número romano indica el número de residuos de NAcGlu. C<sub>x:x</sub> indica la longitud del ácido graso y el número de dobles enlaces que presenta. NMe grupo *N*-metilo y S grupo sulfato.

Anexo 2 – FN producidos por *R. tropici* CIAT 899 y sus estirpes derivadas en presencia de estrés salino (300 mM NaCl).

Estructura	CIAT 899	<i>nodD1::Ω</i>	<i>nodD2::Ω</i>	<i>nodD3::Ω</i>	<i>nodD4::Ω</i>	<i>nodD5::Ω</i>	<i>nrcR::Ω</i>
II Hex (C <sub>18:0</sub> )	-	-	-	-	-	-	+
II Hex-ol (C <sub>18:0</sub> )	-	-	-	-	+	+	-
III (C <sub>16:0</sub> )	+	+	+	-	+	+	+
III (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+	+	+	+	+	+
III (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+	+	+	+	+
III (C <sub>18:0</sub> )	-	-	-	-	+	+	+
III (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	-	+	+	+	-	+
III (C <sub>18:0</sub> , NMe)	-	-	-	-	+	+	+
III Hex (C <sub>18:0</sub> , NMe)	-	-	-	-	-	-	+
III (C <sub>20:1</sub> )	-	-	-	-	-	+	+
III (C <sub>20:1</sub> , NMe)	-	-	-	-	+	-	+
III Hex (C <sub>18:1</sub> )	-	-	-	-	+	+	-
III Hex-ol (C <sub>18:1</sub> )	-	-	-	-	+	-	-
III Hex (C <sub>18:1</sub> , NMe)	-	-	-	-	+	+	+
III Hex-ol (C <sub>18:0</sub> , NMe)	-	-	-	-	+	-	-
IV (C <sub>14:0</sub> )	+	+	-	+	-	-	+
IV (C <sub>14:0</sub> , NMe)	+	+	-	+	-	-	+
IV (C <sub>16:1</sub> )	+	+	+	-	-	+	-
IV (C <sub>16:1</sub> , NMe)	-	-	-	-	-	-	+

Estructura	CIAT 899	<i>nodD1</i> ::Ω	<i>nodD2</i> ::Ω	<i>nodD3</i> ::Ω	<i>nodD4</i> ::Ω	<i>nodD5</i> ::Ω	<i>nrcR</i> ::Ω
IV (C <sub>16:0</sub> )	+	+	+	+	+	+	+
IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+	+	+	+	+	+
IV (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+	+	+	+	+
IV (C <sub>18:0</sub> )	+	-	-	+	+	+	+
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+	+	+	+	+	+
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	-	-	+	+	+	+
IV (C <sub>20:0</sub> )	-	-	-	-	-	-	+
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	+	-	-	-	-	-	+
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	+	-	-	-	-	-	+
IV (C <sub>20:1</sub> , NMe)	-	-	-	-	+	-	+
IV (C <sub>20:0</sub> , NMe)	-	-	-	-	-	-	+
IV (C <sub>20:0</sub> , NMe, S)	-	-	-	-	-	-	+
V (C <sub>14:0</sub> )	-	+	-	-	-	-	-
IV Hex (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	-	-	-	+	-	+
IV Hex-ol (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	-	-	+	+	-	-
IV Hex (C <sub>18:0</sub> )	-	-	-	+	+	-	-
IV Hex (C <sub>18:1</sub> )	+	+	-	-	+	+	-
V (C <sub>14:0</sub> , NMe)	+	+	+	+	-	-	+
IV Hex (C <sub>18:0</sub> , NMe)	-	-	-	-	+	-	+
IV Hex (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	-	-	+	-	-	+
V (C <sub>16:0</sub> )	+	+	+	-	+	+	-
IV Hex-ol (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	-	-	-	-	-	-
IV Hex-ol (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	-	-	-	+	-	+
IV Hex (C <sub>20:1</sub> , NMe)	-	-	-	-	-	-	+
IV Hex (C <sub>20:0</sub> , NMe)	-	-	-	-	-	-	+
V (C <sub>16:1</sub> , NMe)	+	+	+	+	-	-	+
V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+	+	+	+	+	+
V (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+	-	+	+	+
V (C <sub>18:0</sub> )	+	-	-	+	+	+	+
V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+	+	+	+	+	+
V (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	-	-	+	+	+	+
V (C <sub>20:0</sub> , NMe)	-	-	-	-	+	-	+
V (C <sub>20:1</sub> )	-	-	-	-	-	-	+
V (C <sub>20:1</sub> , NMe)	+	-	-	+	+	-	+
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, S)	+	-	+	+	-	-	+
V (C <sub>18:0</sub> , S)	-	-	-	-	+	+	-
V (C <sub>18:1</sub> , S)	+	+	+	-	-	-	-
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	+	+	+	+	+	+	+
V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	+	-	-	+	+	+	+
V (C <sub>20:0</sub> , S)	-	-	-	-	-	-	+
V (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)	+	-	-	+	+	-	+
V (C <sub>20:0</sub> , NMe, S)	+	-	-	-	+	-	+

(+) indica FN detectados y (-) no detectados. El número romano indica el número de residuos de NAcGlu. C<sub>x</sub>:x indica la longitud del ácido graso y el número de dobles enlaces que presenta. NMe grupo *N*-metilo, S grupo sulfato y Hex hexosa.

### Anexo 3 – FN producidos por *R. tropici* CIAT 899 y sus estirpes derivadas en presencia de apigenina (3,7 μM).

Estructura	CIAT 899	<i>nodD1</i> ::Ω	<i>nodD2</i> ::Ω	<i>nodD3</i> ::Ω	<i>nodD4</i> ::Ω	<i>nodD5</i> ::Ω	<i>nrcR</i> ::Ω
III (C <sub>14:0</sub> , NMe)	-	-	+	-	-	-	-
III (C <sub>16:0</sub> )	-	+	+	-	-	-	+
III (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+	+	-	+	+	+
III (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+	-	+	-	+
III (C <sub>18:0</sub> )	+	-	-	-	-	+	+
III (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	-	+	+	+	+	+

Estructura	CIAT 899	<i>nodD1</i> ::Ω	<i>nodD2</i> ::Ω	<i>nodD3</i> ::Ω	<i>nodD4</i> ::Ω	<i>nodD5</i> ::Ω	<i>nrcR</i> ::Ω
III (C <sub>18:0</sub> , NMe)	-	-	-	-	+	+	-
III (C <sub>20:1</sub> )	-	-	-	-	-	+	-
IV (C <sub>12:0</sub> , NMe)	-	-	-	+	-	-	-
IV (C <sub>14:0</sub> )	+	+	-	+	-	+	+
IV (C <sub>14:1</sub> , NMe)	+	-	-	-	-	-	-
IV (C <sub>18:1</sub> ) dNAC	-	-	-	+	-	-	-
IV (C <sub>14:0</sub> , NMe)	+	+	+	+	+	+	+
IV (C <sub>16:1</sub> )	+	+	+	-	-	+	-
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe) dNAC	-	-	-	+	-	-	-
IV (C <sub>16:0</sub> )	+	+	+	-	+	+	+
IV (C <sub>16:1</sub> , NMe)	+	+	+	-	+	+	+
IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+	+	+	+	+	+
IV (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+	+	+	+	+
IV (C <sub>18:0</sub> )	+	+	+	+	-	+	+
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	-	+	+	+	+	+
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	-	+	+	+	+	+
IV (C <sub>20:1</sub> )	+	-	-	+	+	+	+
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	-	-	+	-	-	+	-
IV (C <sub>16:0</sub> , NMe) dNAC	-	-	-	+	-	-	-
V (C <sub>14:0</sub> )	+	+	-	-	-	+	-
V (C <sub>18:1</sub> , dNAC)	+	-	-	+	-	-	-
IV Hex (C <sub>18:1</sub> )	-	-	-	-	+	-	-
V (C <sub>14:0</sub> , NMe)	+	+	+	+	+	+	+
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, dNAC)	+	-	-	+	-	-	-
IV Hex (C <sub>18:1</sub> , NMe)	-	-	-	-	-	+	-
V (C <sub>16:0</sub> )	+	+	-	-	+	+	+
IV Hex-ol (C <sub>18:1</sub> , NMe)	-	-	+	-	-	+	-
V (C <sub>16:1</sub> , NMe)	+	+	+	+	-	+	+
V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+	+	+	+	+	+
V (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+	-	+	-	-
V (C <sub>18:0</sub> )	-	-	-	-	+	-	+
V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+	+	+	+	+	+
V (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	-	+	+	+	+	+
V (C <sub>20:1</sub> )	-	-	+	-	-	+	+
V (C <sub>20:1</sub> , NMe)	-	-	-	-	-	-	+
V (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)	-	-	-	-	-	-	+
V (C <sub>14:0</sub> , NMe, S)	-	-	-	-	-	+	-
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, S)	+	-	+	-	-	+	+
V (C <sub>18:1</sub> , S)	+	+	-	-	+	+	+
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	+	+	+	+	+	+	+
V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	-	-	-	-	-	-	+

(+) indica FN detectados y (-) no detectados. El número romano indica el número de residuos de NAcGlu. C<sub>x</sub>:x indica la longitud del ácido graso y el número de dobles enlaces que presenta. NMe grupo *N*-metilo, S grupo sulfato, Hex hexosa, Hex-ol hexitol, dNAC glucosamina deacetilada.



ARTÍCULOS PUBLICADOS  
CON LOS DATOS OBTENIDOS  
EN LA TESIS DOCTORAL

---





RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Regulatory *nodD1* and *nodD2* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 and their roles in the early stages of molecular signaling and host-legume nodulation

Pablo del Cerro<sup>1†</sup>, Amanda Alves Paiva Rolla-Santos<sup>2†</sup>, Douglas Fabiano Gomes<sup>2</sup>, Bettina Berquó Marks<sup>2</sup>, Francisco Pérez-Montaño<sup>1</sup>, Miguel Ángel Rodríguez-Carvajal<sup>3</sup>, André Shigueyoshi Nakatani<sup>2</sup>, Antonio Gil-Serrano<sup>3</sup>, Manuel Megías<sup>1</sup>, Francisco Javier Ollero<sup>1</sup> and Mariangela Hungria<sup>2\*</sup>

## Abstract

**Background:** Nodulation and symbiotic nitrogen fixation are mediated by several genes, both of the host legume and of the bacterium. The rhizobial regulatory *nodD* gene plays a critical role, orchestrating the transcription of the other nodulation genes. *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 is an effective symbiont of several legumes—with an emphasis on common bean (*Phaseolus vulgaris*)—and is unusual in carrying multiple copies of *nodD*, the roles of which remain to be elucidated.

**Results:** Phenotypes, Nod factors and gene expression of *nodD1* and *nodD2* mutants of CIAT 899 were compared with those of the wild type strain, both in the presence and in the absence of the *nod*-gene-inducing molecules apigenin and salt (NaCl). Differences between the wild type and mutants were observed in swimming motility and IAA (indole acetic acid) synthesis. In the presence of both apigenin and salt, large numbers of Nod factors were detected in CIAT 899, with fewer detected in the mutants. *nodC* expression was lower in both mutants; differences in *nodD1* and *nodD2* expression were observed between the wild type and the mutants, with variation according to the inducing molecule, and with a major role of apigenin with *nodD1* and of salt with *nodD2*. In the *nodD1* mutant, nodulation was markedly reduced in common bean and abolished in leucaena (*Leucaena leucocephala*) and siratro (*Macropitilium atropurpureum*), whereas a mutation in *nodD2* reduced nodulation in common bean, but not in the other two legumes.

**Conclusion:** Our proposed model considers that full nodulation of common bean by *R. tropici* requires both *nodD1* and *nodD2*, whereas, in other legume species that might represent the original host, *nodD1* plays the major role. In general, *nodD2* is an activator of *nod*-gene transcription, but, in specific conditions, it can slightly repress *nodD1*. *nodD1* and *nodD2* play other roles beyond nodulation, such as swimming motility and IAA synthesis.

**Keywords:** *nodD* gene, Nod factors, Nodulation, Symbiosis, Nitrogen fixation, *Rhizobium tropici*

## Background

Bacteria commonly known as rhizobia are capable of establishing symbioses with several leguminous species, forming specific structures, the root nodules, where the process of biological fixation of atmospheric nitrogen takes place, bringing important contributions to agriculture and

to the environment [1–3]. Legume nodulation requires a cascade of molecular signals exchanged between the host plant and the rhizobium. This molecular dialogue begins with the exudation of flavonoids from the legume, which are recognized by the bacterium. When induced by these plant molecules, rhizobia synthesize lipochitooligosaccharides (LCOs), also known as Nod factors, responsible for launching the nodulation process [3–8]. It is noteworthy that an increasing number of reports show that Nod factors may play roles beyond the nodulation process, including

\* Correspondence: mariangela.hungria@embrapa.br

†Equal contributors

<sup>2</sup>Embrapa Soja, C.P. 231, 86001-970 Londrina, Paraná, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

stimulation of photosynthesis, improvements in plant growth and grain yield and changes in immune responses in both legumes and non-legumes [9-12].

We consider *nodD* as the most intriguing regulatory nodulation gene; it belongs to the LysR family of transcription regulators, and it is constitutively expressed and responsible for the transcription of other nodulation genes in the presence of suitable plant inducers, usually flavonoids, thus initiating the nodulation process [8,13,14]. Furthermore, many other symbiosis-related phenotypes, such as polysaccharide production, phytohormone synthesis, motility, quorum-sensing and the activation of the type-III secretion system are directly or indirectly regulated by means of inducing flavonoids via NodD in rhizobia [15-20]. Studies of genomes of rhizobia indicate that, depending on the rhizobial species, there are one to five copies of *nodD*. In the species that possess only one copy of this gene, such as *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii, a mutation usually results in loss of nodulation, whereas, in the presence of multiple copies, as in *Sinorhizobium* (= *Ensifer*) *meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli and *Bradyrhizobium japonicum*, an intricate interaction between the *nodD* genes seems to occur and the nodulation is not completely suppressed [21-23].

*Rhizobium tropici* strain CIAT 899 is an effective microsymbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the tropical acid soils of South America. Notable properties of this strain are its high tolerance of environmental stresses and its broad legume host-range [24-26]. Another intriguing feature of CIAT 899 is its capacity for producing a large variety of Nod factors [27,28]. Interestingly, this bacterium is able to produce these key symbiotic molecules under abiotic stresses, such as acid and saline conditions, in the absence of plant-molecular signals [28-30]. In a pioneering study, five distinct *nodD*-hybridizing DNA regions were identified in CIAT 899 [31], later confirmed as five *nodD* genes in the sequenced genome of the strain [32]. The *nodD1* gene preceding the *nodABC* operon seems to play the major role in nodulation [31], but a more precise study of the regulatory functions of *nodD1* in *R. tropici* is lacking. In addition, the role of *nodD2*, present in some rhizobial species, is unclear. It has been reported to be a repressor of the *nodABC* operon, leading to a negative effect on Nod-factor production in *Sinorhizobium* (= *Ensifer*) *fredii* strain NGR 234 [33]. A suppressive role has also been observed in *B. japonicum* [23] and a negative regulation by NodD2 products was reported in *Bradyrhizobium* (*Arachis*) [34].

Here we report a study in which phenotypes, Nod factors and gene expression of mutants of nodulation genes *nodD1* and *nodD2* of strain CIAT 899 were compared with those of the wild type strain, to help to elucidate the roles of these regulatory genes.

## Results and discussion

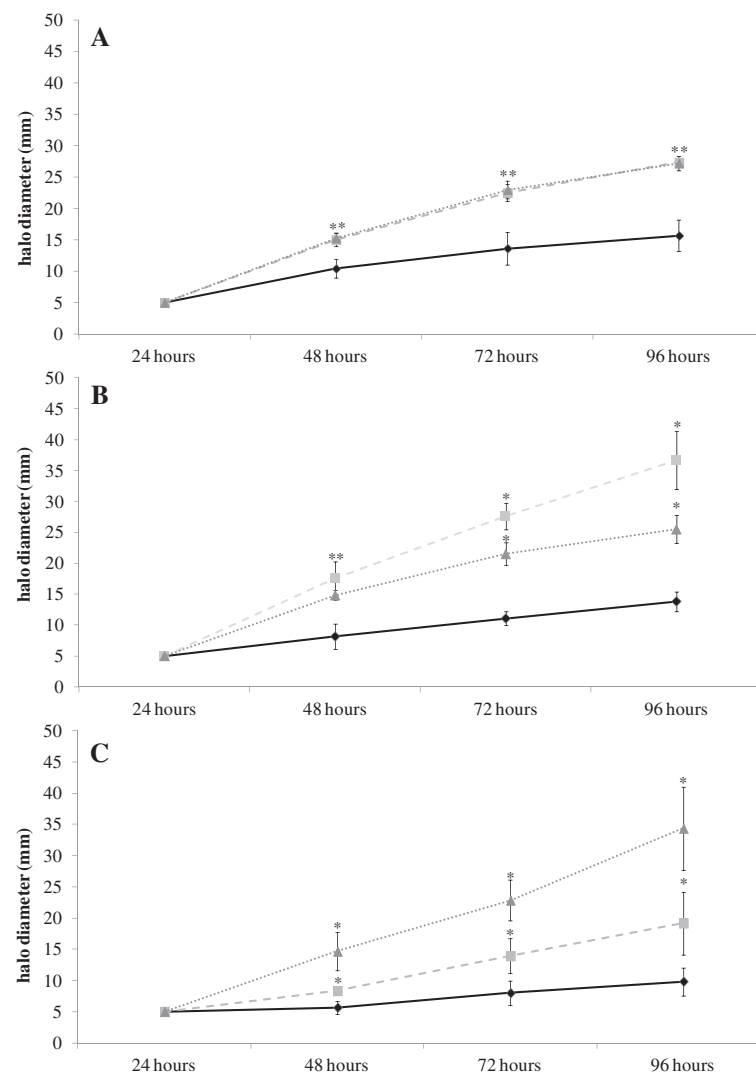
### Phenotypic characterization of wild type and mutant strains

As defined in the genome of *R. tropici* strain CIAT 899 [32], *nodD1* precedes the *nodABC* operon, while *nodD2*, corresponding to *nodD5* described by van Rhijn et al. [31], is adjacent to the *nodA2* and *hnsT* genes (Additional file 1: Figure S1). *R. tropici* CIAT 899 *nodD1* mutant was obtained in a previous work by insertion of a Km<sup>R</sup> cassette into a unique *XhoI* restriction site located on the gene [30]. As described in the Material and Methods section, the *nodD2* mutant was obtained after deletion of a 0.6 kb *PstI* fragment of the gene and the insertion in its place of the  $\Omega$  interposon (Additional file 1: Figure S1).

Growth rate was not affected by mutation in *nodD1* or *nodD2* genes of *R. tropici* CIAT 899 (data not shown). However, it is known that some bacterial properties may be regulated via NodD proteins, such as EPS (exopolysaccharide) production, LPS (lipopolysaccharide) profiles, swimming and swarming motilities, biofilm formation and IAA (indole acetic acid) synthesis, among others (e.g., [15-20]). We evaluated some these properties in the wild type and mutant strains in the presence or absence of two *nod*-gene inducing molecules, apigenin (3.7  $\mu$ M) and salt (NaCl 300 mM). Results showed statistical differences only in swarming motility (Figure 1) and in the production of IAA (Figure 2).

Swarming motility is caused by rotation of single or multiple flagellae along wetted surfaces [35] and, in certain rhizobia, is altered in the presence of legume root exudates that are rich in flavonoids [36]. Our experiments showed that, under control conditions, both *nodD* mutants showed more swarming motility than did the wild type strain. Interestingly, these differences were even stronger when the medium was augmented with apigenin for the *nodD1* mutant and with NaCl for the *nodD2* mutant (Figure 1). Therefore, the results suggest a constitutive suppression of swarming by NodD1 and NodD2 proteins.

IAA is an essential plant hormone that promotes growth, including lateral-root proliferation. Previous work has demonstrated that synthesis of this molecule is regulated by NodD1 and NodD2 in *S. fredii* strain NGR234 [16]. In CIAT 899, our experiments showed an increase in the production of IAA in the presence of apigenin and NaCl (Figure 2), suggesting that both inducing molecules promote the synthesis of this phytohormone. This finding is supported by the presence of a *nod*-box upstream of the IAA operon in the genome of CIAT 899 [32]. In addition, NodD1 seems to be the main regulator in the presence of apigenin, since, in this mutant, the production of IAA was significantly lower than in the presence of NaCl. The production of IAA in the *nodD2* mutant was strongly reduced when the medium was supplemented with NaCl (Figure 2),



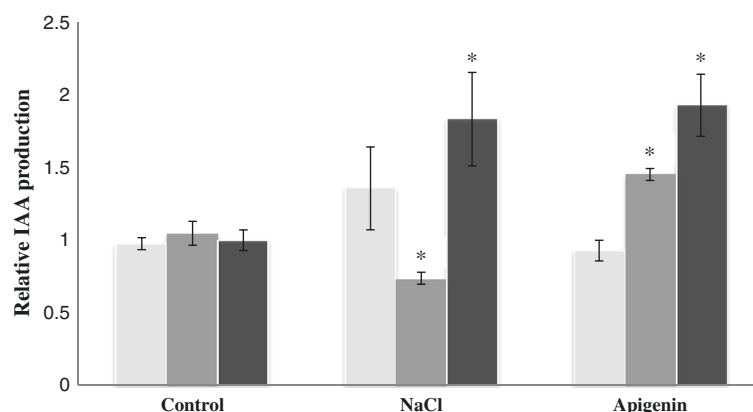
**Figure 1** Swarming motility phenotype of the *R. tropici* CIAT 899 wild type and *nodD1* and *nodD2* mutants. Quantified swarm ring diameters of wild type strain (continuous line), the *nodD1* mutant (striped line) and the *nodD2* mutant (dotted line). Values are the averages of three swarm plates per strain. *nodD1* and *nodD2* mutant parameters were individually compared with the parental strain CIAT 899 parameters by using the Mann–Whitney non-parametric test. Values tagged by \* are significantly different at the level  $\alpha = 5\%$ . Swarming motility in: **A.** TY medium, **B.** TY medium supplemented with  $3.7 \mu\text{M}$  of apigenin, and **C.** TY medium supplemented with  $300 \text{ mM}$  of NaCl.

suggesting that this regulator may be mainly implied in the activation of the IAA operon in the presence of salt. Altogether, the results indicate a predominant role of NodD1 in activation of the IAA gene by apigenin and a predominant role of NodD2 when the inducing molecule is NaCl.

The nodulation phenotype in common bean was first evaluated in pouches bags, where it was possible to observe that a mutation in *nodD1* caused a significant decrease in nodule number of common bean; to a lesser extent, a decrease was also observed with a mutation in *nodD2* (Additional file 2: Figure S2). In both leucaena [*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit] and siratro [*Macroptilium atropurpureum* (DC.) Urb.], no nodules

were observed when plants were inoculated with the *nodD1* mutant, but apparently no differences were observed when plants of both species were inoculated with the *nodD2* mutant in comparison with plants inoculated with the wild type strain (data not shown).

Nodulation of the type and mutants was confirmed by growing plants in larger pots, in Leonard jars containing sterile substrate. In common bean, a mutation in *nodD1* did not suppress nodulation, but caused a reduction of 82% in nodule number (Table 1). The absence of nodulation in both leucaena and siratro when inoculated with the *nodD1* mutant was confirmed. *Vis-à-vis* the *nodD2* mutant, nodulation of common bean was reduced by 55%, and no statistical differences in relation to the wild



**Figure 2** Indole-3-acetic acid (IAA) relative production by *R. tropici* CIAT 899 wild type, and by the *nodD1* and *nodD2* mutants. Bacteria were grown in TY medium containing tryptophan in absence and presence of apigenin (3.7  $\mu$ M) or NaCl (300 mM). Supernatants were taken 96 h after the addition of flavonoid or salt. IAA production was calculated relative to the production without inducing molecules of the wild type strain by using the Mann–Whitney non-parametrical test. The asterisks indicate a significant different at the level  $\alpha = 5\%$ . Black bars: CIAT 899. Light gray bars: *nodD1* mutant. Dark gray bars: *nodD2* mutant.

type strain were observed in the nodulation of either leucaena or siratro. However, shoot dry weight of the leucaena plants inoculated with the *nodD2* mutant was lower than with the wild type ( $\alpha = 10\%$ ) (Table 1).

In rhizobial species with more than one copy of the regulatory *nodD* gene, *nodD1* preceding the *nodABC* operon has been recognized as the main gene regulating nodulation e.g. [23,33,34,37–39]. However, reports show that the role of each *nodD* copy, their responses to flavonoids, and the nodulation phenotypes vary on a case-by-case basis with the rhizobium strain and the host-plant species/cultivar. An intricate pattern of responses in nodulation leads to the assumption that *S. meliloti* utilizes the three copies of *nodD* to optimize the interaction with each of its legume hosts [37,40]. A mutation in *nodD1* of *S. meliloti* delays but does not eliminate nodulation of both alfalfa (*Medicago sativa*) and sweet clover (*Melilotus alba*), and only a triple mutation of *nodD1-nodD2-nodD3* results in absence of nodules [37]. Contrarily, in the promiscuous strain *S. fredii* NGR 234,

capable of nodulating more than 110 plant species, a mutation in *nodD1* abolishes nodulation in several temperate and tropical species [41]. In addition, in *B. japonicum nodD1* is sufficient for nodulation of the putative main host plant, soybean (*Glycine max*), but the additional genes *nodVW* are required for the nodulation of mung bean (*Vigna radiata*), cowpea (*Vigna unguiculata*) and siratro [39,42]. In our study, a mutation in *nodD1* decreased, but did not suppress, nodulation of common bean; however, *nodD1* proved to be essential for the nodulation both of leucaena and of siratro (Table 1).

Still considering nodulation phenotype, in *S. meliloti* the *nodD2* gene did not have any apparent effect on nodulation of either alfalfa or sweet clover [37]. Similarly, no detectable effects were observed by inoculating siratro and cowpea with a *nodD2* mutant of *Bradyrhizobium* (*Arachis*) sp. strain NC92 [34]. Contrarily, in our study, a significant decrease in nodulation of common bean was detected with the mutation in *nodD2*, but no effects were observed in leucaena and siratro (Table 1).

**Table 1** Nodule number ( $n^{\circ}$  plant $^{-1}$ ) and shoot dry weight (g plant $^{-1}$ ) of common bean, leucaena and siratro inoculated with *R. tropici* strain CIAT 899 and *nodD* derivatives

Strains	<i>P. vulgaris</i> <sup>a</sup>		<i>L. leucocephala</i> <sup>a</sup>		<i>M. atropurpureum</i> <sup>a</sup>	
	Nodule number	Shoot dry weight	Nodule number	Shoot dry weight	Nodule number	Shoot dry weight
<i>R. tropici</i> CIAT899	213 $\pm$ 52	1.82 $\pm$ 0.64	13 $\pm$ 4	0.41 $\pm$ 0.03	34 $\pm$ 8	0.05 $\pm$ 0.01
<i>nodD1</i> mutant	38 $\pm$ 11*	1.42 $\pm$ 0.35	0 $\pm$ 0*	0.09 $\pm$ 0.01*	0 $\pm$ 0*	0.05 $\pm$ 0
<i>nodD2</i> mutant	95 $\pm$ 38*	1.03 $\pm$ 0.27	10 $\pm$ 3	0.36 $\pm$ 0.04**	24 $\pm$ 8	0.05 $\pm$ 0
none	0 $\pm$ 0*	0.80 $\pm$ 0.25*	0 $\pm$ 0*	0.09 $\pm$ 0.01*	0 $\pm$ 0*	0.05 $\pm$ 0

<sup>a</sup>Data represent means  $\pm$  SD (standard deviation) of six jars, each with two plants. *nodD1* and *nodD2* mutant parameters were individually compared with the parental strain CIAT 899 parameters by using the Mann–Whitney non-parametric test. Values tagged by \*and \*\*are significantly different at the level  $\alpha = 5$  and 10%, respectively.

Plants evaluated after 25 (common bean) or 42 days (leucaena and siratro) of growth under controlled conditions.

### Nod factor patterns

*Rhizobium tropici* strain CIAT 899 is known as an interesting strain in relation to its production of a large variety of Nod factors, not only when induced by flavonoids [27,28], but also under high-salinity conditions in the absence of flavonoids [28–30].

A list of all Nod factors detected in the wild type strain in comparison to the *nodD1* and *nodD2* mutants is shown in Tables 2, 3 and 4. Unexpectedly, Nod factors were found in the B<sup>-</sup> medium [43], even in the absence of inducer molecules. In this condition, around ten Nod factors were synthesized, with no significant differences among wild type CIAT 899, *nodD1* and *nodD2* mutants (Table 2). When induced by 3.7 μM apigenin, the synthesis of a variety of Nod factors was confirmed in all strains, such that numerically, 29 Nod factors were detected in the wild type CIAT 899 and 25 in the *nodD2* mutant; a slight reduction was observed with the *nodD1* mutant, but, even then, 20 Nod factors were observed (Table 3). This number is higher than in other wild type rhizobial species, e.g. the four Nod factors identified in *B. japonicum* strain USDA 138 [44]. Up to 36 Nod factors were found in CIAT 899 under saline conditions (Table 4), and in the *nodD1* and *nodD2* mutants the numbers were lower, of 20 and 18 Nod factors, respectively. These results indicate that NaCl has a stronger *nod*-induction capacity than apigenin does, and that it is affected by *nodD2* but not *nodD1*. However, one might also consider that it deserves further studies to investigate the possibility that Nod factors are more stable in a 300 mM NaCl supplemented medium.

The production of a large number of Nod factors in all conditions tested might be related to broad host promiscuity and abiotic-stress tolerance of *R. tropici* [24–26]. The promiscuous *S. fredii* strain NGR 234 also produces a larger number of Nod factors (≥18) [41], and the composition of Nod factors produced by this strain varies with the activity of host-specific nodulation genes [45]. Furthermore, one interesting feature observed in our study was that the Nod factors with structure III (C<sub>18:1</sub>, NMe), IV (C<sub>18:1</sub>, NMe), IV (C<sub>18:0</sub>, NMe), V (C<sub>18:0</sub>, NMe) and V (C<sub>16:0</sub>, NMe, S) were present in the wild type and in the *nodD2* mutant, but not in the *nodD1* mutant; therefore, this structure might be implicated in host-specific nodulation, and could explain why the mutant in the *nodD1* gene is unable to induce nodules on leucaena or siratro. It is also worth mentioning that Folch-Mallol *et al.* [46] described that in CIAT 899 the sulfation of the LCOs, mediated by the *nodHPQ* genes are important for nodulation efficiency on *L. leucocephala*. A mutant in the *nodH* gene induced about half of nodules than those induced by the wild type strain [46]. Interestingly, one of the five LCOs not synthesized by the CIAT 899 *nodD1* mutant is sulphated [V (C<sub>16:0</sub>, NMe, S)] (Tables 3 and 4) and may be important for nodulation on leucaena. However, because the *nodD1* mutant is unable to nodulate leucaena, other LCOs not secreted by this mutant must be important to explain its symbiotic phenotype.

In *R. tropici*, the amount and diversity of Nod factors produced are directly influenced by the conditions of bacterial growth. Our results are consistent with the

**Table 2 Nod factor structure biosynthesized in control condition (B<sup>-</sup> medium) by wild type CIAT 899 and the *nodD1* and *nodD2* mutants**

[M + H] <sup>+</sup> (m/z)	B <sub>i</sub> ions	Structure <sup>a</sup>	CIAT899 <sup>b</sup>	<i>nodD1</i> <sup>b</sup>	<i>nodD2</i> <sup>b</sup>
850	426, 629, 832	III (C <sub>18:1</sub> )	+	+	-
1027	400, 603, 806	IV (C <sub>16:0</sub> )	+	+	+
1041	414, 617, 820	IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)	-	-	+
1053	426, 629, 832	IV (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+
1055	428, 631, 834	IV (C <sub>18:0</sub> )	+	-	-
1067	440, 643, 846	IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+	+
1216	386, 589, 792, 995	V (C <sub>14:0</sub> , NMe)	+	-	+
1230	400, 603, 806, 1009	V (C <sub>16:0</sub> )	+	+	+
1244	414, 617, 820, 1023	V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+	+
1256	426, 629, 832, 1035	V (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+
1270	440, 643, 846, 1049	V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+	+
1350	440, 643, 846, 1049, [M-80] <sup>+</sup> c = 1270	V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	+	+	+
1352	442, 645, 848, 1051, [M-80] <sup>+</sup> c = 1272	V(C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	-	+	-
1378	468, 671, 874, 1077, [M-80] <sup>+</sup> c = 1298	V (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)	-	+	-

<sup>a</sup>NF structures are represented following the convention (Spaink, 1992) [43] that indicates the number of GlcNAc residues in the backbone (Roman numeral), the length and degree of unsaturation of the fatty acyl chain, and the other substituents, which are listed in the order in which they appear, moving clockwise from the fatty acid. NMe, N-methyl group at glucosamine non reducing residue; S, sulfate group at reducing glucosamine residue.

<sup>b</sup>Symbol: + = detected; - = non detected.

<sup>c</sup>These ions arise by loss of a neutral with mass 80 Da, corresponding to the loss of SO<sub>3</sub>.

**Table 3** Nod factor structure biosynthesized in the presence of apigenin (3.7  $\mu$ M) by wild type CIAT899 and the *nodD1* and *nodD2* mutants

[M + H] <sup>+</sup> (m/z)	B <sub>i</sub> ions	Structure <sup>a</sup>	CIAT899 <sup>b</sup>	<i>nodD1</i> <sup>b</sup>	<i>nodD2</i> <sup>b</sup>
810	386, 589	III (C <sub>14:0</sub> , NMe)	-	-	+
824	400, 603	III (C <sub>16:0</sub> )	-	+	+
838	414, 617	III (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+	+
850	426, 629	III (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+
852	428, 631	III (C <sub>18:0</sub> )	+	-	-
864	440, 643	III (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	-	+
999	372, 575, 778	IV (C <sub>14:0</sub> )	+	+	-
1011	384, 597, 790	IV (C <sub>14:1</sub> , NMe)	+	-	-
1013	386, 589, 792	IV (C <sub>14:0</sub> , NMe)	+	+	+
1025	398, 601, 804	IV (C <sub>16:1</sub> )	+	+	+
1027	400, 603, 806	IV (C <sub>16:0</sub> )	+	+	+
1039	412, 615, 818	IV (C <sub>16:1</sub> , NMe)	+	+	+
1041	414, 617, 820	IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+	+
1053	426, 629, 832	IV (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+
1055	428, 631, 834	IV (C <sub>18:0</sub> )	+	+	+
1067	440, 643, 846	IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	-	+
1069	442, 645, 848	IV (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	-	+
1081	454, 657, 860	IV (C <sub>20:1</sub> )	+	-	-
1147	440, 643, 846	IV (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	-	-	+
1202	372, 575, 778, 981	V (C <sub>14:0</sub> )	+	+	-
1214	426, 629, 790, 832, 993 <sup>d</sup>	V (C <sub>18:1</sub> , dNAC)	+	-	-
1216	386, 589, 792, 995	V (C <sub>14:0</sub> , NMe)	+	+	+
1228	440, 643, 846, 1007 <sup>e</sup>	V (C <sub>18:1</sub> , NMe, dNAC)	+	-	-
1230	400, 603, 806, 1009	V (C <sub>16:0</sub> )	+	+	-
1231	440, 643, 846, 1049	IV Hex-ol (C <sub>18:1</sub> , NMe)	-	-	+
1242	412, 615, 818, 1021	V (C <sub>16:1</sub> , NMe)	+	+	+
1244	414, 617, 820, 1023	V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+	+
1256	426, 629, 832, 1035	V (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+
1270	440, 643, 846, 1049	V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+	+
1272	442, 645, 848, 1051	V (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	-	+
1284	454, 657, 860, 1063	V (C <sub>20:1</sub> )	-	-	+
1324	414, 617, 820, 1023	V (C <sub>16:0</sub> , NMe, S)	+	-	+
1336	426, 629, 832, 1035	V (C <sub>18:1</sub> , S)	+	+	-
1350	440, 643, 846, 1049, [M-80] <sup>+c</sup> = 1270	V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	+	+	+

<sup>a</sup>NF structures are represented following the convention (Spaink, 1992) [43] that indicates the number of GlcNAc residues in the backbone (Roman numeral), the length and degree of unsaturation of the fatty acyl chain, and the other substituents, which are listed in the order in which they appear, moving clockwise from the fatty acid. Hex-ol, hexitol (reduced terminal hexose); NMe, *N*-methyl group at glucosamine non reducing residue; S, sulfate group at reducing glucosamine residue.

<sup>b</sup>Symbol: + = detected; - = non detected.

<sup>c</sup>These ions arise by loss of a neutral with mass 80 Da, corresponding to the loss of SO<sub>3</sub>.

<sup>d</sup>Mixture of two Nod Factors, deacetylated at glucosamine residues numbers 2 and 3, respectively.

<sup>e</sup>Nod Factor deacetylated at glucosamine residue number 2.

report that CIAT 899 produces of a high number of Nod factors in the presence of *nod*-gene-inducing molecules [27-30], which provides a better understanding of the

control of Nod-factor biosynthesis, and which, in *R. tropici*, does not follow the classical pathway mediated by flavonoids.



**Table 4** Nod Factor structure biosynthesized in the presence of 300 mM NaCl by wild type CIAT899 and the *nodD1* and *nodD2* mutants

[M + H] <sup>+</sup> (m/z)	B <sub>i</sub> ions	Structure <sup>a</sup>	CIAT 899 <sup>b</sup>	<i>nodD1</i> <sup>b</sup>	<i>nodD2</i> <sup>b</sup>
824	400, 603	III (C <sub>16:0</sub> )	+	+	+
838	414, 617	III (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+	+
850	426, 629	III (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+
864	440, 643	III (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	-	+
999	372, 575, 778	IV (C <sub>14:0</sub> )	+	+	-
1013	386, 589, 792	IV (C <sub>14:0</sub> , NMe)	+	+	-
1025	398, 601, 804	IV (C <sub>16:1</sub> )	+	+	+
1027	400, 603, 806	IV (C <sub>16:0</sub> )	+	+	+
1041	414, 617, 820	IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+	+
1053	426, 629, 832	IV (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+
1055	428, 631, 834	IV (C <sub>18:0</sub> )	+	-	-
1067	440, 643, 846	IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+	+
1069	442, 645, 848	IV (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	-	-
1147	440, 643, 846	IV (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	+	-	-
1149	442, 645, 848	IV (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	+	-	-
1202	372, 575, 778, 981	V (C <sub>14:0</sub> )	-	+	-
1203	414, 617, 820, 1023	IV Hex (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	-	-
1205	414, 617, 820, 1023	IV Hex-ol (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	-	-
1215	426, 629, 832, 1035	IV Hex (C <sub>18:1</sub> )	+	+	-
1216	386, 589, 792, 995	V (C <sub>14:0</sub> , NMe)	+	+	+
1229	440, 643, 846, 1049	IV Hex (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	-	-
1230	400, 603, 806, 1009	V (C <sub>16:0</sub> )	+	+	+
1231	440, 643, 846, 1049	IV Hex-ol (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	-	-
1233	442, 645, 848, 1051	IV Hex-ol (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	-	-
1242	412, 615, 818, 1021	V (C <sub>16:1</sub> , NMe)	+	+	+
1244	414, 617, 820, 1023	V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+	+
1256	426, 629, 832, 1035	V (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+
1258	428, 631, 834, 1037	V (C <sub>18:0</sub> )	+	-	-
1270	440, 643, 846, 1049	V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+	+
1272	442, 645, 848, 1051	V (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	-	-
1298	468, 671, 874, 1077	V (C <sub>20:1</sub> , NMe)	+	-	-
1324	414, 617, 820, 1023	V (C <sub>16:0</sub> , NMe, S)	+	-	+
1336	426, 629, 832, 1035	V (C <sub>18:1</sub> , S)	+	+	+
1350	440, 643, 846, 1049, [M-80] <sup>†c</sup> = 1270	V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	+	+	+
1352	442, 645, 848, 1051	V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	+	-	-
1378	468, 671, 874, 1077	V (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)	+	-	-
1380	470, 673, 876, 1079	V (C <sub>20:0</sub> , NMe, S)	+	-	-

<sup>a</sup>NF structures are represented following the convention (Spaink, 1992) [43] that indicates the number of GlcNAc residues in the backbone (Roman numeral), the length and degree of unsaturation of the fatty acyl chain, and the other substituents, which are listed in the order in which they appear, moving clockwise from the fatty acid. Hex, hexose; Hex-ol, hexitol (reduced terminal hexose); NMe, *N*-methyl group at glucosamine non reducing residue; S, sulfate group at reducing glucosamine residue.

<sup>b</sup>Symbol: + = detected; - = non detected.

<sup>c</sup>These ions arise by loss of a neutral with mass 80 Da, corresponding to the loss of SO<sub>3</sub>.

### Gene expression

In various strains of rhizobia, the *nodD1* gene is the chief regulator of Nod-factor biosynthesis and symbiotic phenotype e.g. [34,37,38,47]. Contrarily, *nodD2* has been proposed as a repressor of *nod*-gene expression [33,39,48,49], affecting the bacterial Nod-factor profile. We performed gene expression studies with the wild type and *nodD1* and *nodD2* mutants, to improve our understanding of the roles of these two genes (Figure 3).

We evaluated the relative expression of the *nodC* gene (Figure 3A), which controls the elongation of the oligo-saccharide chain of Nod factors and is transcribed with the activation of *nod* genes. The relative expression of *nodC* was lower for both mutants in comparison to the wild type strain, both in the apigenin and in the salt treatments (Figure 3A).

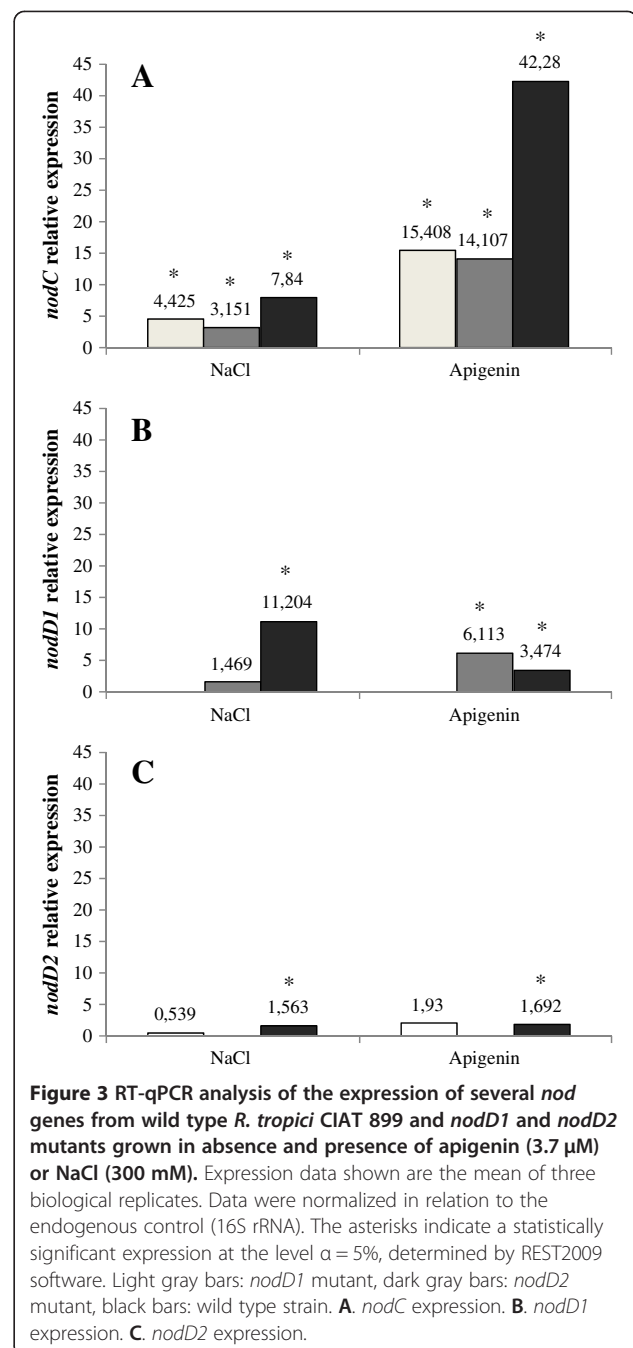
Significant expressions of the *nodD1* gene was observed in the WT strain both with salt and apigenin, while for the *nodD2* mutant it was statistically significant only when induced with apigenin, and higher than in the WT (Figure 3B).

In relation to the expression of *nodD2*, CIAT 899 WT strain significantly expressed the gene both with salt and apigenin. Contrarily, no statistically significant expression was observed for the *nodD1* mutant in none of the conditions evaluated (Figure 3C). However, we must consider that the expression levels of *nodD2* were all very low, and numerically even higher for the *nodD1* mutant in the presence of apigenin, therefore no strong conclusion can be taken from this assay at this moment (Figure 3C).

All together, these results indicate that the *nodD1* is a positive regulator gene, while *nodD2* may positively or negatively regulate the expression of the *nodD1* gene. Supporting these results is evidence of the involvement of *nodD2* in the regulation of the expression of *nodD1* by binding to *nod* box-like sequences located upstream of its coding region [33,49].

### Proposal of a regulatory model for *nodD1* and *nodD2* genes of *R. tropici*

A graphic summary of the main features of the wild type CIAT 899 and *nodD1* and *nodD2* mutants is shown in Additional file 3: Figure S3. In our study a major role of *nodD1* in *R. tropici* CIAT 899 was confirmed. In the presence of the *nod*-gene-inducer apigenin, *nodD1* greatly increased the expression of *nodC* (42-fold), decreasing to 15-fold when the gene was mutated. Similar responses, but lower in magnitude, were observed under saline conditions (Figure 3A). Although confirming a major role of *nodD1*, the results also indicate that other *nodD* genes are involved in the activation of *nodC*, in the presence both of flavonoids and of salts.



Still in relation to *nodD1*, a mutation abolished nodulation in leucaena and siratro, but not in common bean. As *nodD1* gene is the chief regulator of Nod-factor biosynthesis and thus nodulation of the host plant e.g. [5,8,43,44], our results suggest that common bean might not be the main host of *R. tropici*, although it has been largely isolated from this host legume in acid soils of South America [24,26,50-52]. Indeed, doubts about common bean as the main host of *R. tropici* have been raised, giving support to the hypothesis that the species



might be an original symbiont of another indigenous legume, further “adapting” to common bean [50]. *R. tropici* has been isolated from common bean and other indigenous legumes in Europe, Africa, Australia, and North America [50], and results of some studies suggest the following as original host candidates for *R. tropici*: *Gliricidia* spp., from which the strain has been isolated in Mexico [53] and Brazil [54]; *Acaciella angustissima* in Mexico [55]; and *Mimosa* spp. in Brazil [54].

Understanding the relation between Nod factors and host specificity has been a goal of several studies, but without full success. In our research, we found that Nod factors of the following structures, III (C<sub>18:1</sub>, NMe), IV (C<sub>18:1</sub>, NMe), IV (C<sub>18:0</sub>, NMe), V (C<sub>18:0</sub>, NMe) and V (C<sub>16:0</sub>, NMe, S) (Tables 3 and 4) might be related—to a greater or lesser extent—to the nodulation of the original host plant, as they are absent in the *nodD1* mutant. We have also confirmed the great variety of Nod factors produced by *R. tropici*, as reported before [27–30], even in the absence of *nod*-gene inducers [29,30] (Additional file 3: Figure S3). We propose a new, constitutive mechanism of Nod-factor synthesis that is highly enhanced when environmental conditions are stressful, such as strongly acidic pH or salinity. Some transcriptional regulators may be activated in these conditions and they could be responsible for the regulation of *nod*-gene expression via *nodD* regulators.

In various rhizobial strains, *nodD2* has been described as a repressor of the expression of *nod* genes e.g. [23,33,39,49]. For example, in *B. japonicum*, induction of *nodC* by flavonoids is virtually suppressed by elevated levels of NodD2 [23], and in *S. fredii* extra plasmid copies of *nodD2* reduced the level of *nodD1* transcripts to below the limits of detection [49]. However, there is still no evidence that the suppression by NodD2 is mediated by *nodD1*. In our study, we found that *nodD2* activated *nodC* at similar levels as those observed for *nodD1* with both apigenin and salt. However, a slight repression of *nodD1* by *nodD2* was observed in the presence of apigenin (Figure 3B). Accordingly, we hypothesize that *nodD2* is usually an activator of *nod*-gene transcription, although, in the presence of some flavonoids it may slightly repress *nodD1*. Nevertheless, if this repression is biologically significant, it remains to be determined, as no differences in nodulation were observed for leucaena or siratro in the absence of *nodD2*, whereas nodulation was decreased in common bean.

Our model contends that full nodulation of common bean by *R. tropici* requires both *nodD1* and *nodD2*, while, in other plant species that might represent the original host, *nodD1* plays the major role. *nodD2* is not a strong repressor as described in other rhizobial species, and, in general, plays a role as an activator of *nod*-gene transcription, but, in specific conditions, it may slightly

repress *nodD1*. The *nodD* regulation in *R. tropici* CIAT 899 resembles the pattern observed in *S. meliloti*—need for three copies of *nodD* to optimize the interaction with each of its legume hosts [40]. The biological significance of producing an abundance of Nod factors is not completely understood yet, but we hypothesize that represents an evolutionary strategy to avoid abiotic stresses by nodulating a range of legume species. Reports show that *nod* genes may also control other functions that contribute to nodulation, as described for *nodD2* in the exopolysaccharide synthesis of *S. fredii* [38], and chaperones and other genes by *nodD1* in *S. meliloti* [56], *inter alia*. Our results demonstrate extra roles for *nodD1* and *nodD2* of *R. tropici* in swarming motility and IAA synthesis.

## Conclusions

Our model proposes that full nodulation of common bean by *R. tropici* requires both *nodD1* and *nodD2*, while in other plant species that might represent the original host *nodD1* plays the major role. Contrarily to other rhizobial species, *nodD2* of *R. tropici* is usually not a strong repressor of *nod*-gene transcription. *R. tropici* synthesizes a variety of Nod factors that might be related to the ability of nodulating a variety of legume species, representing an evolutionary strategy of the symbiosis under abiotic stressful conditions. *nodD1* and *nodD2* of *R. tropici* also play roles in swarming motility and IAA synthesis.

## Methods

### Bacterial strains, plasmids, media, and growth conditions

*Rhizobium tropici* CIAT 899 and derivative strains were grown at 28°C on tryptone yeast (TY) medium [57], B<sup>−</sup> minimal medium [43] or yeast-extract mannitol (YM) medium [58], supplemented when necessary with apigenin to a final concentration of 3.7 μM or with NaCl at 300 mM. *Escherichia coli* strains were cultured on Luria-Bertani (LB) medium [59] at 37°C. When required, the media were supplemented with the appropriate antibiotics as described by Lamrabet *et al.* [60]. *R. tropici* RSP82 [30] was used as a *nodD1* mutant derivative of *R. tropici* CIAT899 (Km<sup>R</sup> 30 μg mL<sup>−1</sup>).

To obtain the *nodD2* mutant, primer pairs *nodD2*-F (5′ – GTA GGC CAT AAT GTC CAG A) and *nodD2*-R (5′ – GCG GCT TTA TAC TCA CCA) were used for amplifying the *nodD2* gene. The 1450-bp PCR product was cloned into pGEM<sup>+</sup>-T Easy (Promega) (Amp<sup>R</sup> 100 μg mL<sup>−1</sup>). The PCR-amplified *nodD2* fragment was then excised from the plasmid obtained with the endonuclease *EcoRI* and cloned into the vector pK18mob [61], which is suicide in rhizobia, confers resistance to kanamycin (km<sup>R</sup> 30 μg mL<sup>−1</sup>) and was previously digested also with *EcoRI*. This new plasmid was digested with the

enzyme *Pst*I, which cuts the *nodD2* gene in two sites, releasing a fragment of approximately 600 pb. The rest of the plasmid was treated with the Klenow enzyme to convert the cohesive ends to blunt ends. This treated plasmid was ligated with a 2-Kb DNA fragment containing the  $\Omega$  interposon [carrying the spectinomycin resistance gene ( $\text{spc}^R$  100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )], which was obtained from a previous digestion of the pHP45 $\Omega$  plasmid [62] with the *Sma*I enzyme (blunt end). The resulting plasmid was transformed into the *E. coli* strain DH5 $\alpha$ . Plasmids were transferred from *E. coli* to *Rhizobium* strains by conjugation, as described by Simon [63], using plasmid pRK2013 [64] as helper. The plasmid generated was used for the homogenization of the mutated version of the *nodD2* gene in *R. tropici* CIAT 899 by using the methodology previously described [65]. The homogenization was confirmed by DNA-DNA hybridization. For this purpose, DNA was blotted to Hybond-N nylon membranes (Amersham, UK), and the DigDNA method of Roche (Switzerland) was employed according to the manufacturer's instructions. Additional file 1: Figure S1 displays the type of mutation realized to obtain the *nodD2* mutant.

The parental and mutant strains are deposited in the culture collection of the Department of Biology of the Universidad de Sevilla and at the Diazotrophic and Plant Growth Promoting Bacteria Culture Collection of Embrapa Soja (WFCC Collection # 1213, WDCC Collection # 1054).

#### Identification of Nod factors

Purification and LC-MS/MS analyses of Nod factors produced by *R. tropici* CIAT 899 and derivative strains grown in B<sup>-</sup> minimal medium [43] (supplemented when required with NaCl 300 mM or apigenin 3.7  $\mu\text{M}$ ) were performed as described previously [30].

#### RNA isolation, cDNA synthesis and quantitative RT-PCR

Wild type CIAT 899 and *nodD1* and *nodD2* mutants were pre-cultured in 10-mL aliquots of TY medium at 100 rpm and 28°C in the dark. After 48 h, the three strains pre-inoculated were transferred to new media and subjected to the following conditions: control (without induction), 300 mM NaCl and apigenin 3.7  $\mu\text{M}$ . These new cultures were performed in triplicate under the same conditions as for the pre-cultures, 100 rpm and 28°C in the dark, except that were grown into the exponential phase (O.D. at 600 nm of 0.5 to 0.6).

Total RNA was extracted using Trizol<sup>®</sup> reagent (Life Technologies) as previously described [66]. The total concentrations were estimated in a NanoDrop ND 1000 spectrophotometer (NanoDrop-Technologies, Inc., City etc. here and elsewhere) and the integrity was assessed by gel electrophoresis. Extracted RNA samples were submitted to DNaseI treatment (Invitrogen/Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and the first stand of

cDNA was synthesized using SuperscriptIII<sup>™</sup> reverse transcriptase (Invitrogen<sup>™</sup>), according to manufacturer's protocol.

Primers for the RT-qPCR targets, genes *nodD1*, *nodD2* and *nodC*, were designed using Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>), to obtain amplicons of 50–150 bp. With the same software, a primer to 16S rRNA was obtained and applied to normalize the relative expression of the targets. To avoid unspecific alignments, the primer sequences were searched against the *R. tropici* CIAT 899 genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/440224888?report=genbank>). The primer sequences and sizes of the amplified fragments are available in Additional file 4: Table S1.

RT-qPCR reactions were performed in a 7500 RT-qPCR Thermocycler (Applied Biosystems/Life Technologies). The reactions were performed in triplicate for each of the three biological replicates. The Platinum<sup>®</sup> SYBR Green<sup>®</sup> Master Mix kit (Applied Biosystems) was used according to the manufacturer's instructions. Cycling conditions were as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 45 cycles at 95°C for 2 min, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s, in 45 cycles. Rest2009 software package [67] was used to evaluate the data by providing a robust statistical analysis ( $p < 0.05$ ). The normalization of cycle threshold (Ct) of RT-qPCR amplifications was performed based on the selected endogenous gene (16S rRNA).

#### Studies of external exopolysaccharides

The anthrone-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method, which measures the total reducing sugar content in a given sample [68] was used to determine the total carbohydrate amounts of exopolysaccharide (EPS) contained in supernatants from bacterial cultures. For this purpose, *R. tropici* CIAT 899 and derivatives were grown in 5 mL of TY liquid medium on an orbital shaker (180 rpm) for 96 h at 28°C. When required, the media were supplemented with NaCl (300 mM) or apigenin (3.7  $\mu\text{M}$ ). Samples of 1 mL were centrifuged to remove cells. Cell-free culture supernatants were assayed for EPS content via H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hydrolysis in the presence of the colorimetric indicator anthrone. Every experiment was performed three times with three replicates each time. Lipopolysaccharide (LPS) extraction, separation on SDS-PAGE, and silver staining were performed as previously described using the same bacteria, medium and conditions [17].

#### Motility assays

Swimming and swarming phenotypes were tested on TY medium [57] (supplemented when necessary with NaCl 300 mM or apigenin 3.7  $\mu\text{M}$ ) agar plates containing 0.28% or 0.4%, respectively, of Bacto Agar. The strains to be assayed (wild type and mutants) were

grown in 5 mL of TY medium on an orbital shaker (180 rpm) for 96 h at 28°C. Aliquots (2 µL) of culture suspensions were drop-inoculated (swarming assay) or sink-inoculated (swimming assay) onto plates and air-dried in a laminar-flow cabinet. The inoculated plates were wrapped with parafilm and incubated for the required time at 28°C in an upright position. Every experiment was performed three times with three replicates each time.

### Biofilm formation assay

The biofilm formation assay on polystyrene surfaces was performed using the method described by O'Toole and Kolter [69] with modifications [20]. CIAT 899 and mutant strains were grown on TY medium [57] (supplemented with NaCl 300 mM or apigenin 3.7 µM when required) for 7 days with gentle rocking at 28°C. Every experiment was performed three times with eight replicates each time.

### Quantification of indole acetic acid (IAA) production

Quantification of an IAA-like compound from *R. tropici* strain cultures was carried out by using Salkowski colorimetric assays [70], as described previously by Fierro-Coronado *et al.* [71]. To measure IAA production, 5 mL of TY medium with tryptophan (0.4 g L<sup>-1</sup>) (supplemented when required with NaCl 300 mM or apigenin 3.7 µM) were inoculated and incubated during 96 h at 28°C on an orbital shaker (180 rpm) with *R. tropici* strains. Of these cultures, samples of 1 mL were centrifuged to remove cells. Cell-free culture supernatants were assayed for IAA production. Every experiment was performed three times with eight replicates each time.

### Nodulation assays

*nodD1* and *nodD2* mutants were grown in YM medium until a concentration of 10<sup>9</sup> cells mL<sup>-1</sup> was achieved, to be used as inoculum. Surface-sterilized seeds [58] were used for the assays with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), leucaena [*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit] and siratro [*Macroptilium atropurpureum* (DC) Urb.]. Pre-germinated seeds (about 2 days after germination) were placed in sterilized pouches or Leonard jars containing N-free nutrient solution [58], with 1 mL of inoculum of each strain added and verified for nodulation capacity after 25 (common bean) or 42 days (leucaena and siratro) with a 16-h 25°C/18°C photoperiod and about 70% relative humidity. Shoots were dried at 65°C until constant weight was achieved, and then weighed. Experiments were performed three times.

## Additional files

**Additional file 1: Figure S1.** Information about the *nodD1* and *nodD2* genes of *R. tropici* used in our study. A. Gene neighborhood of *nodD1* and *nodD2* genes in the genome of *R. tropici* strain CIAT 899. B. Location of primers (dark arrows) used to perform RT-qPCR experiments. C. Schematic representation of the *nodD2* mutation.

**Additional file 2: Figure S2.** Nodulation phenotype in common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with CIAT 899 and derivative *nodD* strains assayed in pouch bags. Experiment performed under controlled conditions of growth chamber and plants harvested at 25 days after inoculation. A. wild type strain. B. *nodD1* mutant. C. *nodD2* mutant. D. Uninoculated.

**Additional file 3: Figure S3.** Main properties observed in wild type (WT), *nodD1* and *nodD2* mutants of *R. tropici* strain CIAT 899.

**Additional file 4: Table S1.** Sequences of the primers used in the RT-qPCR and sizes of the PCR products obtained.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: MM, FJO, MH. Performed the experiments: PC, APR-S, DFG, BBM, FP-M, MAR-C, ASN, AG-S, FJO. Analyzed the data: all authors. Contributed reagents/materials/analysis tools: MM, FJO, MH. Wrote the paper: PC, APR-S, DFG, MM, FJO, MH. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

The study was partially supported by AGL2012-38831, Embrapa, CNPq (National Council for Scientific and Technological Development), Project Science without Borders (400205/2012-5). Authors acknowledge Dr. Jesiane S.S. Batista for helping in obtaining the *nodD2* mutant and Allan R.J. Eaglesham for suggestions on the manuscript and English review. A.A.P.R.-Santos acknowledges a posdoc fellowship from Project Science without Borders, D.F.Gomes a PhD fellowship from Project Repensa and A.S.Nakatani a posdoc fellowship from Fundação Araucária. M.H. is also a research fellow from CNPq. We thank the Centro de Investigación, Tecnología e Innovación (CITIUS) of the University of Seville for MS facilities. Approved for publication by the Editorial Board of Embrapa Soja as manuscript 315/2014.

### Author details

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes, 6 Apdo Postal 41012 Sevilla, Spain. <sup>2</sup>Embrapa Soja, C.P. 231, 86001-970 Londrina, Paraná, Brazil. <sup>3</sup>Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Apdo Postal 553, 41071 Sevilla, Spain.

Received: 29 December 2014 Accepted: 9 March 2015

Published online: 28 March 2015

### References

- Peoples MB, Brockwell J, Herridge DF, Rochester IJ, Alves BJR, Urquiaga S, et al. The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis*. 2009;48:1–17.
- Ormeño-Orrillo E, Hungria M, Martínez-Romero E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: *The prokaryotes - prokaryotic physiology and biochemistry*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag; 2013. p. 427–51.
- Van Hameren B, Hayashi S, Gresshoff PM, Ferguson BJ. Advances in the identification of novel factors required in soybean nodulation, a process critical to sustainable agriculture and food security. *J Plant Biol Soil Health*. 2013;1:6.
- Denarié J, Debbelle F, Promé JC. *Rhizobium* lipo-chitinoligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Ann Rev Biochem*. 1996;65:503–35.
- Schlaman HRM, Phillips DA, Kondorosi E. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. In: Spalink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ, editors. *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of*



- Model Plant-Associated Bacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1998. p. 361–86.
6. Geurts R, Bisseling T. *Rhizobium* Nod factor perception and signalling. *Plant Cell*. 2002;14:S239–49.
  7. Brencic A, Winans SC. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005;69:155–94.
  8. Oldroyd GE. Speak, friend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11:252–63.
  9. Khan W, Prithiviraj B, Smith DL. Nod factor [Nod Bj V (C18:1, MeFuc)] and lumichrome enhance photosynthesis and growth of corn and soybean. *J Plant Physiol*. 2008;163:1342–51.
  10. Liang Y, Cao Y, Tanaka K, Thibivilliers S, Wan J, Choi J, et al. Nonlegumes respond to rhizobial Nod factors by suppressing the innate immune response. *Science*. 2013;341:1384–7.
  11. Marks BB, Nogueira MA, Hungria M, Megías M. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of Bradyrhizobium spp and Azospirillum brasilense inoculants with soybean and maize. *AMB Express*. 2013;3:21.
  12. Smith S, Habib A, Kang Y, Leggett M, Diaz-Zorita M. LCO applications provide improved responses with legumes and non-legumes. In: De Bruijn F, editor. *Biological Nitrogen Fixation*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2015. p. 1073–81.
  13. Kondorosi E, Gyuris J, Schmidt J, John M, Duda E, Hoffmann B, et al. Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *Embo J*. 1989;8:1331–40.
  14. Spaink HP. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:257–88.
  15. Krause A, Doerfel A, Gottfert M. Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2002;15:1228–35.
  16. Theunis M, Kobayashi H, Broughton WJ, Prinsen E. Flavonoids, NodD1, NodD2, and Nod-Box NB15 modulate expression of the *y4wEFG* locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Mol Plant Microbe Interact*. 2004;17:1153–61.
  17. Vinardell JM, Lopez-Baena FJ, Hidalgo A, Ollero FJ, Bellogin R, Espuny MR, et al. The effect of FITA mutations on the symbiotic properties of *Sinorhizobium fredii* varies in a chromosomal-background-dependent manner. *Arch Microbiol*. 2004;181:144–54.
  18. López-Baena FJ, Vinardell JM, Pérez-Montaña F, Crespo-Rivas JC, Bellogin RA, Espuny Mdel R, et al. Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. *Microbiology*. 2008;154:1825–36.
  19. Pérez-Montaña F, Guasch-Vidal B, González-Barroso S, López-Baena FJ, Cubo T, Ollero FJ, et al. Nodulation-gene-inducing flavonoids increase overall production of autoinducers and expression of N-acyl homoserine lactone synthesis genes in rhizobia. *Res Microbiol*. 2011;162:715–23.
  20. Pérez-Montaña F, Jiménez-Guerrero I, Del Cerro P, Baena-Ropero I, López-Baena FJ, Ollero FJ, et al. The symbiotic biofilm of *Sinorhizobium fredii* SMH12, necessary for successful colonization and symbiosis of *Glycine max* cv Osumi, is regulated by quorum sensing systems and inducing flavonoids via NodD1. *PLoS One*. 2014;9:e105901.
  21. Hungria M, Johnston AWB, Phillips DA. Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris*) on *nodD*-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Mol Plant Microbe Interact*. 1992;5:199–203.
  22. Broughton WJ, Jabbouri S, Perret X. Keys to symbiotic harmony. *J Bacteriol*. 2000;182:5641–52.
  23. Garcia MLJ, Dunlap J, Loh J, Stacey G. Phenotypic characterization and regulation of the *nolA* gene of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe Interact*. 1996;9:625–35.
  24. Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J Syst Bacteriol*. 1991;41:417–26.
  25. Hernández-Lucas I, Segovia L, Martínez-Romero E, Pueppke SG. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulates *Phaseolus vulgaris* L. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61:2775–9.
  26. Hungria M, Andrade DS, Chueire LMO, Probanza A, Guitierrez-Manero FJ, Megías M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol Biochem*. 2000;32:1515–28.
  27. Poupot R, Martínez-Romero E, Promé JC. Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentascaccharides containing an N-methyl-N-acylglucosaminyl terminus. *Biochemistry*. 1993;32:10430–5.
  28. Morón B, Soria-Díaz ME, Ault J, Verroios G, Noreen S, Rodríguez-Navarro DN, et al. Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. *Chem Biol*. 2005;12:1029–40.
  29. Estevez J, Soria-Díaz ME, De Cordoba FF, Moron B, Manyani H, Gil A, et al. Different and new Nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899 following Na<sup>+</sup> stress. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;293:220–31.
  30. Guasch-Vidal B, Estévez J, Dardanelli MS, Soria-Díaz ME, De Córdoba FF, Balog CI, et al. High NaCl concentrations induce the *nod* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899 in the absence of flavonoid inducers. *Mol Plant Microbe Interact*. 2013;26:451–60.
  31. van Rhijn PJS, Feys B, Verreth C, Vanderleyden J. Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT899 and BR816. *J Bacteriol*. 1993;175:438–47.
  32. Ormeño-Orrillo E, Menna P, Gonzaga LA, Ollero FJ, Nicolas MF, Rodrigues EP, et al. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics*. 2012;13:735.
  33. Fellay R, Hanin M, Montorzi G, Frey J, Freiberg C, Golinowski W, et al. *nodD2* of *Rhizobium* sp. NGR234 is involved in the repression of the *nodABC* operon. *Mol Microbiol*. 1998;27:1039–50.
  34. Gillette WK, Elkan GH. *Bradyrhizobium* (*Arachis*) sp. strain NC92 contains two *nodD* genes involved in the repression of *nodA* and a *nolA* gene required for the efficient nodulation of host plants. *J Bacteriol*. 1996;178:2757–66.
  35. Berg HC. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:19–54.
  36. Tambalo DD, Vanderlinde EM, Robinson S, Halmillawewa A, Hynes MF, Yost CK. Legume seed exudates and *Physcomitrella patens* extracts influence swarming behavior in *Rhizobium leguminosarum*. *Can J Microbiol*. 2014;60:15–24.
  37. Honma MA, Ausubel FM. *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the *nodD* symbiotic regulatory gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:8558–62.
  38. Appelbaum ER, Thompson DV, Idler K, Chartrain N. *Rhizobium japonicum* USDA 191 has two *nodD* genes that differ in primary structure and function. *J Bacteriol*. 1998;170:12–20.
  39. Loh J, Stacey G. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuit. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:10–7.
  40. Honma MA, Asomaning M, Ausubel FM. *Rhizobium meliloti* *nodD* genes mediate host-specific activation of *nodABC*. *J Bacteriol*. 1990;172:901–11.
  41. Relić B, Fellay R, Lewin A, Perret K, Price NPJ, Rochepeau P, et al. *nod* genes and Nod Factors of *Rhizobium* species NGR 234. In: Palacios R, Mora J, Newton WE, editors. *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1993. p. 183–9.
  42. Göttfert M, Groß P, Hennecke H. Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc Natl Acad Sci*. 1990;87:2680–4.
  43. Spaink HP. Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and questions. *Plant Mol Biol*. 1992;20:977–86.
  44. Muñoz N, Soria-Díaz ME, Manyani H, Sánchez-Matamoros RC, Serrano AG, Megías M, et al. Structure and biological activities of lipochitooligosaccharide nodulation signals produced by *Bradyrhizobium japonicum* USDA 138 under saline and osmotic stress. *Biol Fertil Soils*. 2014;50:207–15.
  45. Jabbouri S, Relić B, Hanin M, Kamalaprija P, Burger U, Promé D, et al. *nolO* and *nolE* (HsnIII) of *Rhizobium* sp. NGR234 are involved in 3-O-carbamoylation and 2-O-methylation of Nod factors. *J Bio Chem*. 1998;273:12047–55.
  46. Folch-Mallol JL, Marroqui S, Sousa C, Manyani H, Lopez-Lara IM, van der Drift KM, et al. Characterization of *Rhizobium tropici* CIAT899 nodulation factors: the role of *nodH* and *nodPQ* genes in their sulfation. *Mol Plant Microbe Interact*. 1996;9(3):151–63.
  47. Vargas C, Martínez LJ, Megías M, Quinto C. Identification and cloning of nodulation genes and host specificity determinants of the broad host-range *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* strain CIAT899. *Mol Microbiol*. 1990;4:1899–910.
  48. Machado D, Krishnan HB. *nodD* alleles of *Sinorhizobium fredii* USDA 191 differentially influence soybean nodulation, *nodC* expression, and production of exopolysaccharides. *Curr Microbiol*. 2003;47:134–7.
  49. Machado D, Pueppke SG, Vinardell JM, Ruiz-Sainz JE, Krishnan HB. Expression of *nodD1* and *nodD2* in *Sinorhizobium fredii*, a nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes. *Mol Plant Microbe Interact*. 1998;11:375–82.

50. Gomes DF, Ormeno-Orrillo E, Hungria M. Biodiversity, symbiotic efficiency and genomics of *Rhizobium tropici* and related species. In: De Bruijn F, editor. Biological Nitrogen Fixation. New Jersey, Hoboken: Wiley-Blackwell; 2015. p. 747–56.
51. Grange L, Hungria M, Graham PH, Martínez-Romero E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. *Soil Biol Biochem*. 2007;39(4):867–76.
52. Pinto FGS, Hungria M, Mercante FM. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol Biochem*. 2007;39(8):1851–64.
53. Acosta-Durán C, Martínez-Romero E. Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. *Arch Microbiol*. 2002;178:161–4.
54. Menna P, Hungria M, Barcellos FG, Bangel EV, Hess PN, Martínez-Romero E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst Appl Microbiol*. 2006;29:315–32.
55. Rincón-Rosales R, Lloret L, Ponce E, Martínez-Romero E. Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. *FEMS Microbiol Ecol*. 2009;67:103–17.
56. Capela D, Carrere S, Batut J. Transcriptome-based identification of the *Sinorhizobium meliloti* NodD1 regulon. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:4910–3.
57. Beringer JE. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol*. 1974;84:188–98.
58. Vincent JM. The modified Fahraeus slide technique. In: Vincent JM, editor. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications; 1970.
59. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
60. Lamrabet Y, Bellogin RA, Cubo T, Espuny MR, Gil-Serrano A, Krishnan HB, et al. Mutation in GDP-fucose synthesis genes of *Sinorhizobium fredii* alters Nod factors and significantly decreases competitiveness to nodulate soybeans. *Mol Plant-Microbe Interact*. 1999;12:207–17.
61. Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. 1994;145:69–73.
62. Prentki P, Krisch HM. *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*. 1984;29:303–13.
63. Simon R. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vivo constructed Tn5-Mob transposon. *Mol Gen Genet*. 1984;196:413–20.
64. Figurski DH, Helinski DR. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76:1648–52.
65. López-Baena FJ, Monreal JA, Pérez-Montaña F, Guasch-Vidal B, Bellogin RA, Vinardell JM, et al. The absence of Nops secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103 increases GmPR1 expression in Williams soybean. *Mol Plant Microbe Interact*. 2009;22:1445–54.
66. Gomes DF, Batista JSS, Rolla AAP, Silva LPS, Bloch C, Galli-Terasawa LV, et al. Proteomic analysis of free-living *Bradyrhizobium diazoefficiens*: highlighting potential determinants of a successful symbiosis. *BMC Genomics*. 2014;15:643. doi: 10.1186/1471-2164-15-643.
67. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:e36.
68. Tomlinson AD, Ramey-Hartung B, Day TV, Merritt PM, Fuqua C. *Agrobacterium tumefaciens* ExoR represses succinoglycan biosynthesis and is required for biofilm formation and motility. *Microbiology*. 2010;156:2670–81.
69. O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*. 1998;28:449–61.
70. Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61:793–6.
71. Fierro-Coronado RA, Quiroz-Figueroa FR, García-Pérez LM, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Maldonado-Mendoza IE. IAA-producing rhizobacteria from chickpea (*Cicer arietinum* L.) induce changes in root architecture and increase root biomass. *Can J Microbiol*. 2014;60:639–48.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Opening the “black box” of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899

Pablo del Cerro<sup>1</sup>, Amanda Alves Paiva Rolla-Santos<sup>2</sup>, Douglas Fabiano Gomes<sup>2</sup>, Bettina Berquó Marks<sup>2</sup>, María del Rosario Espuny<sup>1</sup>, Miguel Ángel Rodríguez-Carvajal<sup>3</sup>, María Eugenia Soria-Díaz<sup>4</sup>, André Shigueyoshi Nakatani<sup>2</sup>, Mariangela Hungria<sup>2\*</sup>, Francisco Javier Ollero<sup>1</sup> and Manuel Megías<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Transcription of nodulation genes in rhizobial species is orchestrated by the regulatory *nodD* gene. *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 is an intriguing species in possessing features such as broad host range, high tolerance of abiotic stresses and, especially, by carrying the highest known number of *nodD* genes—five—and the greatest diversity of Nod factors (lipochitooligosaccharides, LCOs). Here we shed light on the roles of the multiple *nodD* genes of CIAT 899 by reporting, for the first time, results obtained with *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* mutants.

**Methods:** The three *nodD* mutants were built by insertion of  $\Omega$  interposon. Nod factors were purified and identified by LC-MS/MS analyses. In addition, *nodD1* and *nodC* relative gene expressions were measured by quantitative RT-PCR in the wt and derivative mutant strains. Phenotypic traits such as exopolysaccharide (EPS), lipopolysaccharide (LPS), swimming and swarming motilities, biofilm formation and indole acetic acid (IAA) production were also performed. All these experiments were carried out in presence of both inducers of CIAT 899, apigenin and salt. Finally, nodulation assays were evaluated in up to six different legumes, including common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).

**Results:** Phenotypic and symbiotic properties, Nod factors and gene expression of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* mutants were compared with those of the wild-type (WT) CIAT 899, both in the presence and in the absence of the *nod*-gene-inducing molecule apigenin and of saline stress. No differences between the mutants and the WT were observed in exopolysaccharide (EPS) and lipopolysaccharide (LPS) profiles, motility, indole acetic acid (IAA) synthesis or biofilm production, either in the presence, or in the absence of inducers. Nodulation studies demonstrated the most complex regulatory system described so far, requiring from one (*Leucaena leucocephala*, *Lotus burtii*) to four (*Lotus japonicus*) *nodD* genes. Up to 38 different structures of Nod factors were detected, being higher under salt stress, except for the *nodD5* mutant; in addition, a high number of structures was synthesized by the *nodD4* mutant in the absence of any inducer. Probable activator (*nodD3* and *nodD5*) or repressor roles (*nodD4*), possibly via *nodD1* and/or *nodD2*, were attributed to the three *nodD* genes. Expression of *nodC*, *nodD1* and each *nodD* studied by RT-qPCR confirmed that *nodD3* is an activator of *nodD1*, both in the presence of apigenin and salt stress. In contrast, *nodD4* might be an inducer with apigenin and a repressor under saline stress, whereas *nodD5* was an inducer under both conditions.

(Continued on next page)

\* Correspondence: mariangela.hungria@embrapa.br

<sup>2</sup>Embrapa Soja, C.P. 231, 86001-970 Londrina, Paraná, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

(Continued from previous page)

**Conclusions:** We report for *R. tropici* CIAT 899 the most complex model of regulation of nodulation genes described so far. Five *nodD* genes performed different roles depending on the host plant and the inducing environment. Nodulation required from one to four *nodD* genes, depending on the host legume. *nodD3* and *nodD5* were identified as activators of the *nodD1* gene, whereas, for the first time, it was shown that a regulatory *nodD* gene—*nodD4*—might act as repressor or inducer, depending on the inducing environment, giving support to the hypothesis that *nodD* roles go beyond nodulation, in terms of responses to abiotic stresses.

**Keywords:** Biological nitrogen fixation, LCO, *nodD* gene, Nod factors, Symbiosis

## Background

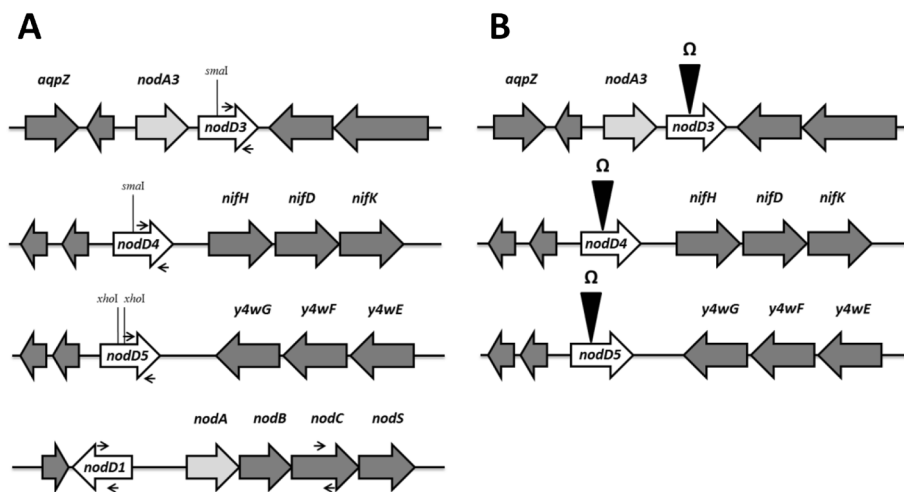
The association of rhizobial strains and legumes represents one of the most perfect symbiotic interactions, in which a sophisticated machinery has been developed in both partners for millions of years, now contributing the highest inputs of nitrogen on Earth [1–4]. A fascinating step in the symbiosis is represented by the molecular signal dialogue established between the compatible partners, starting with the message sent with the exudation of molecules—mainly flavonoids—from the host legume, and replied with the synthesis of lipochitooligosaccharides (LCOs)—also known as Nod factors—by the rhizobium [5–10]. The “maestro” that orchestrates this symphony in the bacterium is the regulatory *nodD* gene, constitutively expressed and responsible for initiating the transcriptions of the remaining nodulation genes [9–12].

*Rhizobium tropici* is abundantly found in tropical acid soils of South America; its main characteristics are high tolerance of environmental stresses and ability to nodulate a broad range of legumes, the most economically important being common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [13–16]. Probably the most intriguing feature of the common bean-*R. tropici* symbiosis is the abundance of flavonoid

*nod*-gene inducers released by the host legume [17, 18], and the synthesis of the largest known variety of Nod factors by *R. tropici* CIAT 899 [19–23]. Also unique are the observations that *R. tropici* CIAT 899 is capable of producing LCOs under abiotic stresses—such as acidic and saline conditions—in the absence of plant-molecular signals [20–23], and interestingly, some LCOs are produced even in the absence of saline stress and flavonoids [23].

Rhizobial species described so far have one to five regulatory *nodD* genes. *R. tropici* CIAT 899 and closely related species carrying the symbiovar tropici (*R. leucaenae* CFN 299, *R. freirei* PRF 81) possess the highest numbers, with five copies of *nodD* genes [24, 25]. Elucidating the roles of the five *nodD* genes of CIAT 899 may help to understand their protagonism in host-range characteristics and in the strategies that the strain uses to circumvent abiotic stresses. It may also contribute to gaining a better understanding of the evolution of symbiotic interactions, since *R. tropici* has a strong resemblance to the pathogen *Agrobacterium* in terms of genes and proteins [25, 26].

As a first study, we shed light on the roles of *nodD1* and *nodD2* of *R. tropici* CIAT 899, with data related to the activation/repression of nodulation genes, their role



**Fig. 1** Gene neighborhood of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes and representation of the mutations. **a** Gene localization in the symbiotic plasmid (pRtCIAT899b) of *R. tropici* strain CIAT 899 and location of primers used to perform RTqPCR experiments (dark arrows); **b** Schematic representation of the *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* mutation

in host range and showing that these two genes have functions beyond nodulation [23]. Here we achieve improved understanding of the mechanisms controlling regulation of the *nodD* genes of CIAT 899, with studies of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* mutants.

## Results and discussion

### Gene localization and phenotypes *in vitro* of the wild type and mutant strains

*nodD* gene nomenclature was used as defined for the genome of *R. tropici* strain CIAT 899 [25]. *nodA3* precedes *nodD3* and is close to an aquaporin; *nodD4* precedes the operon *nifHDK* and *nodD5* is downstream of an operon of hypothetical proteins (Fig. 1). *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes correspond to the *CD5*, *CD21* and *CD29* *nodD*-hybridizing regions of CIAT 899 described by van Rhijn et al. [24], respectively. Mutations in the *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes were achieved as described in the Methods section. In general, evaluations were performed in the absence of any inducer (B<sup>-</sup> medium) [20], in the presence of the *nod*-gene-inducing molecule apigenin (3.7 μM), or under salinity stress (NaCl 300 mM) that also induce the synthesis of Nod factors. The same treatments were used in our previous study with *nodD1* and *nodD2* mutants [23].

Some bacterial properties may be regulated via NodD proteins, and in our previous study we showed that both *nodD1* and *nodD2* have a constitutive suppression role on swarming motility and an activation effect on indole acetic acid (IAA) synthesis [23]. Here, we found no differences between the three mutants and the WT strain

in exopolysaccharide (EPS) and lipopolysaccharide (LPS) profiles, swimming and swarming motilities, biofilm formation, or IAA synthesis (data not shown).

### Symbiotic phenotypes

Symbiotic phenotypes of the WT CIAT 899 and the mutant strains were verified in pots containing sterile substrate (Leonard jars). Previously, we reported that common bean requires both *nodD1* and *nodD2*, whereas *nodD1* was the main nodulation regulator of both leucaena [*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit] and siratro [*Macroptilium atropurpureum* (DC.) Urb.] [23]. For comparison, these results are shown again in Table 1, together with the results obtained with *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* mutants; in addition, the symbiotic properties of all five *nodD* mutants were assayed in two other host legumes, *Lotus burtii* Borsos and *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen.

For the common bean, there were no statistical differences between the WT and the three mutants in terms of the nodulation or shoot dry weight (SDW) parameters, but we should mention that there was a decrease in nodulation, which might indicate effects of minor magnitude due to the mutations, with an emphasis on *nodD5*, where it also affected SDW. Leucaena and siratro also did not show differences in nodulation between the WT and the three mutants, but SDW of leucaena inoculated with *nodD4* and *nodD5* mutants was slightly, but significantly, lower (Table 1).

In relation to the nodulation of *Lotus* species, *nodD1* was the main regulator in *L. japonicus* and very important

**Table 1** Plant responses (nodule number, n°/plant) and shoot dry weight (g/pl) to inoculation of common bean, leucaena, siratro, *Lotus japonicus* and *L. burtii* with *R. tropici* strain CIAT 899 and derivatives. Plants evaluated after 25 (common bean.), 42 days (leucaena and siratro), or 50 days (*Lotus* spp.) of growth under controlled conditions

Strains	<i>P. vulgaris</i>		<i>L. leucocephala</i>		<i>M. atropurpureum</i>		<i>L. japonicus</i>		<i>L. burtii</i>	
	Nodule number	Shoot dry weight	Nodule number	Shoot dry weight	Nodule number	Shoot dry weight	Nodule number	Shoot dry weight	Nodule number	Shoot dry weight
<i>R. tropici</i> CIAT 899	213 ± 52 <sup>a</sup>	1.82 ± 0.64 <sup>a</sup>	13 ± 4 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.03 <sup>a</sup>	34 ± 8 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.01 <sup>a</sup>	22 ± 9	0.064 ± 0.03	11 ± 5	0.04 ± 0.02
<i>nodD1</i> mutant	38 ± 11 <sup>*,a</sup>	1.42 ± 0.35 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>*,a</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>*,a</sup>	0 ± 0 <sup>*,a</sup>	0.05 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>*</sup>	0.007 ± 0.004 <sup>*</sup>	5 ± 2 <sup>*</sup>	0.04 ± 0.02
<i>nodD2</i> mutant	95 ± 38 <sup>*,a</sup>	1.03 ± 0.27 <sup>a</sup>	10 ± 3 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.04 <sup>**,a</sup>	24 ± 8 <sup>a</sup>	0.05 ± 0 <sup>a</sup>	30 ± 10	0.039 ± 0.013 <sup>*</sup>	12 ± 5	0.03 ± 0.01
<i>nodD3</i> mutant	182 ± 25	1.80 ± 0.34	13 ± 3	0.39 ± 0.09	38 ± 12	0.05 ± 0	12 ± 4 <sup>*</sup>	0.025 ± 0.014 <sup>*</sup>	9 ± 4	0.04 ± 0.01
<i>nodD4</i> mutant	190 ± 24	1.84 ± 0.5	14 ± 3	0.37 ± 0.01 <sup>*</sup>	29 ± 8	0.05 ± 0	17 ± 6	0.058 ± 0.052	12 ± 5	0.03 ± 0.02
<i>nodD5</i> mutant	179 ± 16	1.45 ± 0.68	12 ± 4	0.37 ± 0.01 <sup>*</sup>	33 ± 7	0.05 ± 0.01	6 ± 2 <sup>*</sup>	0.021 ± 0.011 <sup>*</sup>	12 ± 2	0.05 ± 0.01
None	0 ± 0 <sup>*</sup>	0.80 ± 0.25 <sup>*</sup>	0 ± 0 <sup>*</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>*</sup>	0 ± 0 <sup>*</sup>	0.05 ± 0	0 ± 0 <sup>*</sup>	0.008 ± 0.004 <sup>*</sup>	0 ± 0 <sup>*</sup>	0.01 ± 0 <sup>*</sup>

<sup>a</sup>After [23]

\*Data represent means ± SD (standard deviation) of 6 jars, each with two plants. *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* mutant parameters were individually compared with the parental strain CIAT 899 parameters by using the Mann-Whitney non-parametric test. Values tagged by \* and \*\* are significantly different at the level α = 10 and 5 %, respectively



for *L. burtii*, whereas *nodD2* did not affect nodulation but resulted in a significant reduction in SDW of *L. japonicus*, indicating that it interferes with the efficiency of nitrogen fixation. In addition, for *L. japonicus*, a mutation in *nodD3* and *nodD5* also affected nodulation and SDW, whereas no effects were observed for *L. burtii* (Table 1).

From these data, we may conclude that full nodulation of common bean requires both *nodD1* and *nodD2* genes, but it is possible that *nodD3* and *nodD5* could make minor contributions that were not statistically detected in our experiments. Therefore, as in several other rhizobial species [27, 28] including the broadly nodulating *S. fredii* NGR 234 [29], *nodD1* is the main gene regulating nodulation of leucaena, siratro, *L. burtii* and *L. japonicus*. Siratro does not require any other *nodD* gene for nodulation, but a non-statistically significant decrease observed with the *nodD2* mutant should be more fully investigated. *Lotus burtii* does not require any of the *nodD* genes except for *nodD1*. In contrast, *L. japonicus* receives contributions from all the *nod* genes except for *nodD4* for nodulation, because with the other *nodD* mutants a reduced SDW was observed (Table 1).

The most intricate pattern of responses in nodulation described so far is that for *Sinorhizobium meliloti*, which utilizes the three copies of *nodD* to optimize nodulation of each of its legume hosts [27]. However, now we present a regulatory pattern that involves from one *nodD* gene (leucaena, *L. burtii*) to four (*L. japonicus*). There were also indications that *nodD* genes influence nodule effectiveness, as shown for *nodD2*, *nodD4* and *nodD5* for leucaena, and *nodD2* for *L. japonicus*. Another particularity for *R. tropici* CIAT 899 was that, in general, *nodD2* was not a repressor of any of the legumes evaluated, contrary to what happens with the broadly nodulating strain NGR 234 [30].

Nod-factor patterns

The interesting roles of Nod factors—which apparently can go further than nodulation—have been broadly investigated over a long period of time [5, 8, 10, 12, 31]. *R. tropici* CIAT 899 synthesises a large variety of Nod factors when induced by flavonoids [19–23], or under abiotic

stress conditions in the absence of flavonoids [2023]; surprisingly, Nod factors are also synthesized in the absence of any known inducer [23].

A variety of Nod-factor structures was synthesized by the *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* mutants (Additional file 1: Table S1, Additional file 2: Table S2 and Additional file 3: Table S3). *nodD3* mutant reduced the number of Nod factors under all three conditions, control, when induced with apigenin and under saline conditions, while *nodD5* mutant had a decrease in the number of Nod factors under control and saline conditions (Table 2). It is noteworthy that *nodD4* increased the number of Nod factors in under salinity, without the induction of apigenin. The larger number of Nod factors was observed under saline conditions for the WT and *nodD4* mutants, whereas similar numbers were observed with apigenin (Table 2). These results add more evidence to the hypothesis that the large production of Nod factors is related to the well known properties of broad host infectivity and the high tolerance of abiotic stresses of *R. tropici*, being able to establish symbioses even under harsh environmental conditions [13–16].

In relation to the Nod-factor structures, the mutations in *nodD3* in general did not result in changes in the molecules produced both in the presence of apigenin and salt. However, in the negative control B<sup>−</sup>, the number of molecules was drastically reduced, which indicates that *nodD3* might be an activator of other regulatory genes such as *nodD1* (Additional file 1: Table S1, Additional file 2: Table S2 and Additional file 3: Table S3). Moreover, CIAT 899 produced only two Nod factors deacetyled in the presence of apigenin [V (C<sub>18:1</sub>) dNAc and V (C<sub>18:1</sub>, NMe) dNAc]. However, the *nodD3* mutant produced five deacetyled Nod factors that were not detected in the LCOs biosynthesized by the *nodD4* and *nodD5* mutants. These results suggest that the *nodD3* gene is important for the deacetylation of Nod factors produced by CIAT 899 in the presence of apigenin. Non-deacetylated Nod factors were detected in control and saline conditions (Additional file 1: Table S1, Additional file 2: Table S2 and Additional file 3: Table S3). Interestingly, it has been suggested that *hsnT* (=noeT) has a role in Nod-factor decoration in *Neorhizobium galegae* [32].

Under saline stress, in addition to an increase in the LCOs synthesized by the *nodD4* mutant, fatty acids of C<sub>14:1</sub> were not found, nor were sulphated molecules of four units of N-acetyl-glucosamine. Not least important, the strong increase in the number of molecules in the *nodD4* mutant might indicate that the gene is a repressor of other regulatory genes, such as *nodD1* (Additional file 1: Table S1, Additional file 2: Table S2 and Additional file 3: Table S3).

For the *nodD5* mutant, no quantitative or qualitative differences in LCOs were observed, whereas important

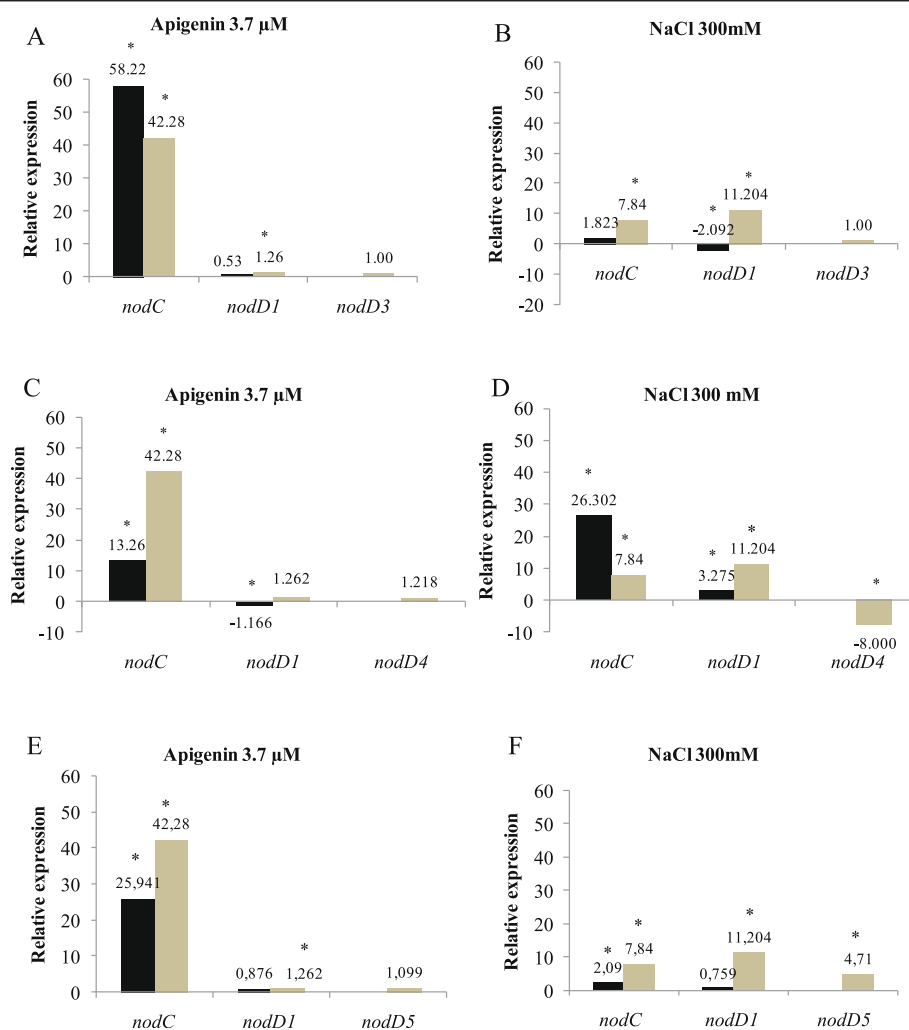
**Table 2** Number of Nod factors produced by the wild type *R. tropici* strain CIAT 899 and the *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* mutants when grown in control B<sup>−</sup> medium [20], with 3.4 μM of apigenin or salt (NaCl 300 mM). The structures of Nod factors under each condition are shown in Additional file 1: Table S1, Additional file 2: Table S2 and Additional file 3: Table S3

	B <sup>−</sup> medium	Apigenin	Salt
CIAT 899 - WT	11	29	36
<i>nodD3</i>	2	21	25
<i>nodD4</i>	15	22	38
<i>nodD5</i>	8	30	26

differences were detected under saline stress. The mutation not only resulted in a decrease in the number of LCOs, but also the molecules included neither fatty acids  $C_{14:0}$ , nor sulphated molecules of 4 units of N-acetylglucosamine. In addition, we did not detect the fatty acids  $C_{20:0}$  or  $C_{20:1}$  - V( $C_{20:0}$ , NMe, S); V( $C_{20:1}$ , NMe) and V( $C_{20:1}$ , NMe,S), found in the WT, *nodD3* and *nodD4* strains in the presence of salt. It is worth mentioning that *nodD1* and *nodD2* mutants also do not produce these factors in the presence of salt [23]. Fatty acids  $C_{20:0}$  or  $C_{20:1}$  under salt stress and/or  $C_{14:0}$  or  $C_{14:1}$  with apigenin might have the participation of genes detected in the genome of CIAT 899 [25], such as *nodE* and *nodF* genes [33]. Consequently, the absence of these fatty acids in *nodD5* mutants under saline stress indicates that other regulatory *nodD* genes were not activated under salt, and *nodD1* and *nodD2* are

strong candidates, as their mutants inhibited the synthesis of these fatty acids. We suggest that *nodD5* could be an activator of *nodD1* or *nodD2* in the presence of salt to allow the expression of genes *nodE-nodF*.

This intricate regulatory mechanism for the production of LCOs involving five *nodD* genes—demonstrated in our study—seems to have no parallel in other rhizobia, especially under saline stress. As the tropical conditions where *R. tropici* is abundantly found are often extreme [34], this might indicate a high degree of evolution to allow the symbioses to form and function under harmful conditions. It is also worth mentioning that several other roles have been attributed to LCOs besides being involved in early steps of nodulation. For example, there are reports that LCO effects resemble those of cytokinins [29], that they have a role in mechanisms related to defense against



**Fig. 2** RT-qPCR analysis of the expression of *nodD* genes from *R. tropici* CIAT 899 and derivatives grown under control (B- medium), in the absence and in the presence of apigenin (3.7 μM) or NaCl (300 mM). Expression data shown are the mean (± standard deviation of the mean) of three biological replicates. Data were normalized in relation to the endogenous control (16S rRNA). The asterisks indicate a statistically significant expression at the level  $\alpha = 5\%$ , determined by REST2009 software. Light gray bars: wild type strain, black bars: mutant. **a, b** - expression induced in the *nodD3* mutant; **c, d** - expression induced in the *nodD4* mutant; **e, f** - expression induced in the *nodD5* mutant

disease [35, 36] and seed germination [37]; therefore, the role of LCO structure in phenotype determination deserves further investigation.

### Gene expression

We performed gene-expression studies with the wild type and *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* mutants. In these studies we evaluated the expression of *nodC*—which controls the elongation of the oligosaccharide chain of Nod factors and is transcribed with the activation of *nod* genes [8]—of the *nodD1* gene and of each of the three *nodD* genes, to improve our understanding of the roles of these three genes. As expected, endogenous expression of all *nodD* genes was consistently low, as these genes are constitutively expressed. In addition, the expression of each *nodD* gene corresponding to each *nodD* mutation was confirmed as null (Fig. 2).

Significant expression of *nodC* for both the WT and the *nodD3* mutant was verified, of 42- and 58-fold, respectively, when induced by apigenin, and, although at basal low levels, *nodD1* expression was significantly increased in the WT strain (Fig. 2a). Under saline stress, a mutation in *nodD3* decreased both *nodC* and *nodD1* expression, confirming the results obtained with Nod factors, that *nodD3* is an activator of *nodD1*, especially under saline conditions (Fig. 2b).

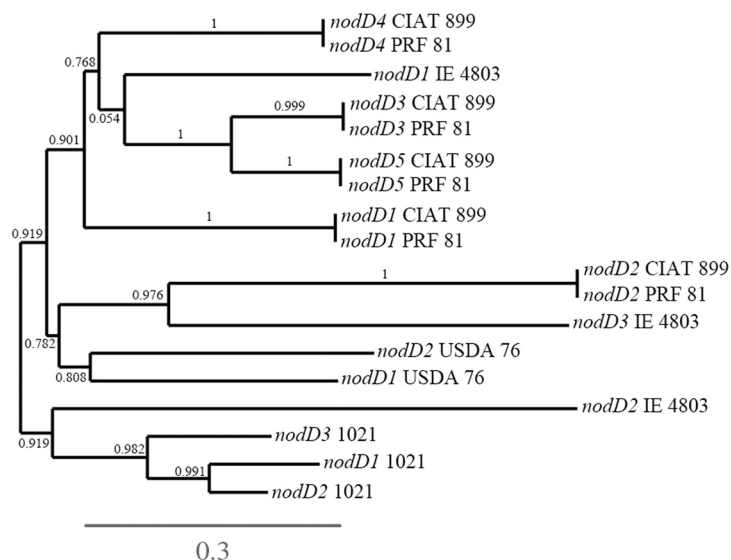
The picture obtained with *nodD4* was somewhat different. A mutation in *nodD4* resulted in a 3-fold decrease, but

not in total inhibition of expression of *nodC* with apigenin; therefore, the results indicate an activation role in the presence of apigenin (Fig. 2c). However, in saline conditions, *nodD4* expression in the WT strain was down-regulated, indicating a repressor role, that was confirmed by an increase of 3.35-fold on *nodC* expression when the gene was mutated Fig. 2d. Therefore, under apigenin *nodD4* acted as an activator and under salt stress as a repressor of other *nod* genes (Fig. 2c, d).

In relation to *nodD5*, the gene proved to be an inducer, increasing the expression of both *nodC* and *nodD1* in the presence of both the inducer molecule apigenin (Fig. 2e) and salt stress (Fig. 2f). These results are consistent with the results based on the synthesis of Nod factors.

### Phylogeny of *nodD* genes

A phylogenetic tree was built to verify the similarities between the five copies of *nodD* genes of CIAT 899, helping to add information about these genes. Figure 3 shows that *nodD2* gene of CIAT 899 is positioned in a different cluster from the other *nodD* genes, showing full similarity with the *nodD2* of *R. freirei* PRF 81, that belongs to the “*R. tropici* group” [38]. Within the same great cluster of the phylogenetic tree, but positioned in another subgroup was the *nodD3* genes of *R. etli* sv phaseoli. The other four copies of *nodD* genes of CIAT 899 were positioned in another great cluster, each one showing full identity with the correspondent *nodD* gene of *R. freirei*.



**Fig. 3** Phylogenetic tree of representatives *nodD* genes of some relevant rizobia. The branches length represents the evolutionary lineages changing over time. The length of the brach represents the amount of changes and it is proportional to the number of nucleotide substitutions per site. The bar at the bottom of the figure provides a scale for the evolution. The numbers next to each node represent a measure of support for the node (between 0 and 1). A high value means that there is strong evidence that the sequences to the right of the node cluster together to the exclusion of any other. Phylogenetic tree was built as described in the Methods section. In this phylogenetic tree, *nodD1* to *nodD5* CIAT 899 correspond to *Rhizobium tropici* CIAT 899 *nodD* genes; *nodD1* to *nodD5* PRF 81 correspond to *Rhizobium freirei* PRF 81 *nodD* genes; *nodD1* to *nodD3* IE 4803 correspond to *Rhizobium etli* sv. phaseoli IE 4803 *nodD* genes; *nodD1* to *nodD3* 1021 correspond to *Sinorhizobium meliloti* 1021 *nodD* genes; and *nodD1* and *nodD2* USDA 76 correspond to *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76 *nodD* genes.

Therefore, apparently *nodD2* had a different evolutionary history from the other *nodD* genes, and as we pointed out before, one important host legume, leucaena does not need *nodD2* for full nodulation, while common bean does. One hypothesis is that *nodD2* could have been acquired in the evolutionary process of getting the ability to nodulate common bean.

#### Why five *nodD* genes?

In contrast to what we have previously reported for *nodD1* and *nodD2* [23], *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* of *R. tropici* CIAT 899 did not affect phenotypic traits such as motility or of IAA synthesis. However, they contributed to the intricate regulatory mechanism of nodulation of different host plants that, overall, may require from one to four genes. It remains to be determined if all five genes contribute to the nodulation of common bean, since minor, but not statistically significant, decreases in nodulation were observed with *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* mutants.

Apparently the increased number of Nod factors and the activation of *nodD1* and *nodC* genes under abiotic stress may be critical for nodulation under abiotic stresses or for enlargement of host range, guaranteeing the survival of both symbiotic partners under harsh environmental conditions. It is surprising that one major host, common bean, releases so many *nod*-gene-inducing molecules [17, 18, 39] and that a main rhizobial symbiont synthesizes so many Nod factors by the action of five *nodD* genes. The results previously obtained with hosts such as leucaena and siratro—and now confirmed with *Lotus* spp.—where *nodD1* played the major role adds weight to the hypothesis that common bean is not the main host for *R. tropici* [23]. One important observation was that the phylogenetic comparisons of *nodD* genes positioned *nodD2* in a different cluster from the other *nodD* genes, what might indicate an evolution in the process of getting the ability to nodulate common bean, the requires both *nodD1* and *nodD2* genes, contrary to hosts as leucaena. Sharing the nodulation responsibility with more than one *nodD* gene, as is the case with common bean, suggests the ultimate evolution of the symbiosis, guaranteeing that nodulation occurs under abiotic stresses.

#### Conclusions

*R. tropici* CIAT 899 is an intriguing rhizobia with high tolerance of environmental stresses, the ability to nodulate a broad range of legume hosts and carrying five copies of the regulatory *nodD* gene [34]. The role of three *nodD* genes of CIAT 899 was investigated for the first time in this study. *nodD3* and *nodD5* were identified as activators of the *nodD1* gene, whereas *nodD4* might act as repressor or inducer, depending on the inducing environment. A large variety of Nod factors was produced by the three mutants when induced by apigenin or salt stress, and also

in the absence of any inducer. We may hypothesize that the high number of *nodD* copies and the synthesis of many Nod factors might help *R. tropici* both in enhancing the host range and in the ability to nodulate the hosts under harsh environmental conditions.

#### Methods

##### Bacterial strains, plasmids, media, and growth conditions

*Rhizobium tropici* CIAT 899 and derivative strains (*nodD3*, *nodD4* and *nodD5* mutants) were grown at 28 °C on tryptone yeast (TY) medium [40], B<sup>-</sup> minimal medium [20] or yeast-extract mannitol (YM) medium [41], supplemented when necessary with apigenin to a final concentration of 3.7 μM or with NaCl at 300 mM. *Escherichia coli* strains were cultured on Luria-Bertani (LB) medium [42] at 37 °C. When required, the media were supplemented with the appropriate antibiotics as described by Lamrabet et al. [43]. The same strategy described before for obtaining *nodD2* mutants of *R. tropici* CIAT 899 [23] was now used to obtain *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* mutants by the insertion in the ORF of these genes of the Ω interposon (carrying the spectinomycin resistance gene (*spc*<sup>R</sup> 100 μg mL<sup>-1</sup>). Briefly, pair primers *nodD3*-F (5' – GAG CTA CCT CGA CTG CTA) and *nodD3*-R (5' – CTA CCG CCA TGA TCA CCA) were used for amplifying *nodD3* gene. The 1500-bp PCR product was cloned in pGEM<sup>+</sup>-T Easy (PRO-MEGA) (Amp<sup>R</sup> 100 μg mL<sup>-1</sup>). The PCR-amplified *nodD3* fragment was cutted with the endonuclease *Sma*I, which cut the *nodD3* gene in one site, disrupting it. The obtained DNA was ligated with Ω, which was previously digested with the *Sma*I enzyme. The ligation mixture was transformed into *E. coli* strain DH5α. The *nodD3*::Ω fragment (3,5 Kb) was excised from pGEM<sup>+</sup>-T Easy with the endonuclease *Eco*RI and cloned in the vector pK18mob [44], that confers resistance to kanamycin (km<sup>R</sup> 30 μg mL<sup>-1</sup>), equally restricted with *Eco*RI.

Pair primers *nodD4*-F (5' – CTG TCG CTC TGA TAT TCG A) and *nodD4*-R (5' – ATA GGA CAG CCT TGG CAA) were used for amplifying *nodD4* gene. The 1497-bp PCR product was cloned in pGEM<sup>+</sup>-T Easy. The PCR-amplified *nodD4* fragment was excised from pGEM<sup>+</sup>-T Easy with the endonuclease *Eco*RI and cloned in the vector pK18mob equally restricted with *Eco*RI. In order to eliminate a *Sal*I site in the polylinker of pK18mob, the plasmid was cut with *Sma*I and *Hind*III and religated. The plasmid containing the PCR-amplified *nodD4* fragment was cut with the endonuclease *Sal*I, which disrupt the *nodD4* gene in one site and then was treated with the Klenow enzyme. The obtained DNA was ligated with the Ω interposon, which was previously digested with the *Sma*I enzyme. The ligation mixture was transformed into *E. coli* strain DH5α.

Pair primers *nodD5*-F (5' – GCT CTT TCT TTC CCA CCA A) and *nodD5*-R (5' – GAT CTG CCG ATG GCT CA) were used for amplifying *nodD5* gene. The 1478-bp



PCR product was cloned in pGEM<sup>®</sup>-T Easy. The PCR-amplified *nodD5* fragment was excised from pGEM<sup>®</sup>-T Easy with the endonuclease *EcoRI* and cloned in the vector pK18mob equally restricted with *EcoRI*. This plasmid was digested with the enzyme *XhoI*, which cut the *nodD5* gene in two sites, releasing a fragment of approximately 18 pb. Rest of the plasmid was treated with Klenow enzyme to convert the cohesive end generated by the enzyme to a blunt end. The obtained DNA was ligated with the  $\Omega$  interposon, which was previously digested with the *SmaI* enzyme (blunt end). The ligation mixture was transformed into *E. coli* strain DH5 $\alpha$ .

In all cases, plasmids harbouring mutation in the *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes, were transferred from *E. coli* to *Rhizobium* strains by conjugation as described by Simon [45] using plasmid pRK2013 [46] as helper. The plasmid generated was used for the homogenization of the mutated version of the *nodDs* gene in *R. tropici* CIAT 899 by using the methodology previously described [47]. The homogenization was confirmed by DNA-DNA hybridization. For this purpose, DNA was blotted to Hybond-N nylon membranes (Amersham, UK), and the DigDNA method of Roche (Switzerland) was employed according to the manufacturer's instructions. A scheme of the mutation generated in the *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes are shown in Fig. 1.

It is worth mentioning that growth rate was not affected by mutation in *nodD3*, *nodD4*, or *nodD5* genes; in addition, for the target mutagenesis of *nod* genes external primers were chosen that would allow to specifically amplify both genes, what was possible because the intergenic regions flanking both genes have different sequences. Therefore, the different phenotypes observed in both mutants are caused by loss of function of these genes. The parental and mutant strains are deposited in the culture collection of the Department of Biology of the Universidad de Sevilla and at the Diazotrophic and Plant Growth Promoting Bacteria Culture Collection of Embrapa Soja (WFCC Collection # 1213, WDCM Collection # 1054).

#### Identification of nod factors

Purification and LC-MS/MS analyses of Nod factors produced by *R. tropici* CIAT 899 and derivative strains grown in B<sup>-</sup> minimal medium (supplemented when required with NaCl 300 mM or apigenin 3.7  $\mu$ M) were performed as described previously [22].

#### RNA isolation, cDNA synthesis and quantitative RT-PCR

Wild-type CIAT 899 and mutants strains were pre-cultured in 10-mL aliquots of TY medium at 100 rpm and 28 °C in the dark. After 48 h, the three strains pre-inoculated were transferred to new media and subjected to the following conditions: control (without induction),

300 mM NaCl and apigenin 3.7  $\mu$ M. These new cultures were performed in triplicate under the same conditions as for the pre-cultures, 100 rpm and 28 °C in the dark, except that were grown into the exponential phase (O.D. at 600 nm of 0.5 to 0.6).

Total RNA was extraction, verification of concentration and integrity and synthesis of cDNA were performed as described before. Primers for the RT-qPCR targets, genes *nodD1*, *nodD3*, *nodD4*, *nodD5* and *nodC*, were designed using Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>), to obtain amplicons of 50–150 bp. With the same software, a primer to 16S rRNA was obtained and applied to normalize the relative expression of the targets. To avoid unspecific alignments, the primer sequences were searched against the *R. tropici* CIAT 899 genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/440224888?report=genbank>). The primer sequences and sizes of the amplified fragments are available in Additional file 4: Table S4. RT-qPCR reactions were performed as described before [23]. Rest2009 software package [48] was used to evaluate the data by providing a robust statistical analysis ( $p < 0.05$ ). The normalization of cycle threshold (Ct) of RT-qPCR amplifications was performed based on the selected endogenous gene (16S rRNA).

#### Phenotypic traits

Analysis of exopolysaccharide (EPS), lipopolysaccharide (LPS), swimming and swarming phenotypes, biofilm formation and quantification of indole acetic acid (IAA) production were performed as described before [23].

#### Nodulation assays

For the evaluation of the symbiotic phenotypes, wild-type *R. tropici* strain CIAT 899 and *nodD1*, *nodD2*, *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* mutants were grown in YM medium until a concentration of  $10^9$  cells mL<sup>-1</sup> was achieved, to be used as inoculum. Surface-sterilized seeds [41] were used for the assays with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), leucaena [*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit] and siratro [*Macroptilium atropurpureum* (DC) Urb.], *Lotus burtii* Borsos, and *Lotus japonicus* (Regel) K.Larsen. Pre-germinated seeds (about 2 days after germination) were placed in sterilized pouches or Leonard jars containing N-free nutrient solution [41], with 1 mL of inoculum of each strain added and verified for nodulation capacity after 25 (common bean), 42 days (leucaena and siratro) and 50 days (*Lotus japonicus* and *Lotus burtii*) with a 16-h 25 °C/18 °C photoperiod and about 70 % relative humidity. Shoots were dried at 65 °C until constant weight was achieved, and then weighed. Experiments were performed three times.

#### Phylogenetic tree construction

Phylogenetic tree was obtained by using online platform (<http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/>) [49]. Nucleotide

sequences of each *nodD* gene were first aligned by MUSCLE [50] and conserved blocks were selected [51]. The phylogenetic tree was obtained by using the maximum-likelihood algorithm [52, 53] and the TreeDyn for visualization [54].

## Additional files

**Additional file 1: Table S1.** Nod Factor structure biosynthesized in control condition (B<sup>-</sup> medium) by wild type CIAT 899 and derivatives. (DOC 45 kb)

**Additional file 2: Table S2.** Nod Factor structure biosynthesized in the presence of apigenin (3.7 μM) by wild type CIAT 899 and derivatives. (DOC 72 kb)

**Additional file 3: Table S3.** Nod Factor structure biosynthesized in the presence of 300 mM NaCl by wild type CIAT 899 and derivatives. (DOC 81 kb)

**Additional file 4: Table S4.** Sequences of the primers used in the RT-qPCR and sizes of the PCR products obtained. (DOC 37 kb)

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: MH, FJO, MM. Performed the experiments: all authors. Analyzed the data: all authors. Contributed reagents/materials/analysis tools: MH, FJO, MM. Wrote the paper: PC, APR-S, DFG, MM, FJO, MH. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

The study was partially supported by AGL2012-38831, Embrapa (02.13.08.001.00.00), CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) - Project Science without Borders (400205/2012-5). A.A.P.R.-Santos acknowledges a posdoc fellowship from project Science without Borders, D.F.Gomes a PhD fellowship from Project Repensa and A.S.Nakatani a posdoc fellowship from Fundação Araucária. M.H. is also a research fellow from CNPq. We thank the Centro de Investigación, Tecnología e Innovación (CITIUS) of the University of Seville for MS facilities. Approved for publication by the Editorial Board of Embrapa Soja as manuscript 146/2015.

## Author details

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes, 6 Apdo Postal 41012, Sevilla, Spain. <sup>2</sup>Embrapa Soja, C.P. 231, 86001-970 Londrina, Paraná, Brazil. <sup>3</sup>Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Apdo Postal 553, 41071 Sevilla, Spain. <sup>4</sup>Centro de Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS), Avda. Reinas Mercedes, 4B, 41012 Sevilla, Spain.

Received: 26 April 2015 Accepted: 8 October 2015

Published online: 26 October 2015

## References

- Graham PH, Vance CP. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Res.* 2000;65:93–106.
- Hungria M, Loureiro MF, Mendes IC, Campo RJ, Graham PH. Inoculant preparation, production and application. In: Newton WE, editor. *Nitrogen fixation: origins, applications and research progress*. Dordrecht: Springer; 2005. p. 223–2254. doi:10.1007/1-4020-3544-6\_11.
- Ormeño-Orrillo E, Hungria M, Martínez-Romero E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: Rosenberg E et al., editors. *The Prokaryotes - prokaryotic physiology and biochemistry*. Berlin Heidelberg: Springer; 2013. p. 427–51. doi:10.1007/978-3-642-30141-4\_72.
- van Hameren B, Hayashi S, Gresshoff PM, Ferguson BJ. Advances in the identification of novel factors required in soybean nodulation, a process critical to sustainable agriculture and food security. *J Plant Biol Soil Health.* 2013;1:6.
- Denarié J, Debbelle F, Promé JC. *Rhizobium* lipo-chitinoligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Ann Rev Biochem.* 1996;65:503–35.
- Hungria M, Stacey G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. *Soil Biol Biochem.* 1997;29:819–30.
- Geurts R, Bisseling T. *Rhizobium* Nod factor perception and signalling. *Plant Cell.* 2002;14 Suppl:S239–49.
- Brenic A, Winans SC. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005;69:155–94.
- Oldroyd GE. Speak, friend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11:252–63.
- Janczarek M, Rachwal K, Marzec A, Grzadziel J, Palusińska-Szys M. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume-rhizobium interactions. *Appl Soil Ecol.* 2015;85:94–113.
- Kondorosi E, Gyuris J, Schmidt J, John M, Duda E, Hoffmann B, et al. Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *Embo J.* 1989;8:1331–40.
- Spaink HP. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:257–88.
- Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J Syst Bacteriol.* 1991;41:417–26.
- Hernández-Lucas I, Segovia L, Martínez-Romero E, Pueppke SG. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulates *Phaseolus vulgaris* L. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:2775–9.
- Hungria M, Andrade DS, Chueire LMO, Probanza A, Guitierrez-Manero FJ, Megías M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol Biochem.* 2000;21:1515–28.
- Pinto FGS, Hungria M, Mercante FM. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol Biochem.* 2007;39(8):1851–64.
- Hungria M, Joseph CM, Phillips DA. Anthocyanidins and flavonols, major *nod* gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 1991;97:751–8.
- Hungria M, Joseph CM, Phillips DA. *Rhizobium nod*-gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 1991;1991(97):759–64.
- Poupot R, Martínez-Romero E, Promé JC. Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing an *N*-methyl-*N*-acylglucosaminyl terminus. *Biochemistry.* 1993;32:10430–5.
- Morón B, Soria-Díaz ME, Ault J, Verroios G, Noreen S, Rodríguez-Navarro DN, et al. Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. *Chem Biol.* 2005;12:1029–40.
- Estevez J, Soria-Díaz ME, De Cordoba FF, Moron B, Manyani H, Gil A, et al. Different and new Nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899 following Na<sup>+</sup> stress. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;293:220–31.
- Guasch-Vidal B, Estévez J, Dardanelli MS, Soria-Díaz ME, de Córdoba FF, Balog CI, et al. High NaCl concentrations induce the *nod* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899 in the absence of flavonoid inducers. *Mol Plant Microbe Interact.* 2013;26:451–60.
- del Cerro P, Rolla-Santos AAP, Gomes DF, Marks BB, Pérez-Montaño F, Rodríguez-Carvajal MA, et al. Regulatory *nodD1* and *nodD2* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 and their roles in the early stages of molecular signaling and host-legume nodulation. *BMC Genomics.* 2015;16(1):251. doi:10.1186/s12864-015-1458-8.
- van Rhijn PJS, Feys B, Verreth C, Vanderleyden J. Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT899 and BR816. *J Bacteriol.* 1993;175:438–47.
- Ormeño-Orrillo E, Menna P, Gonzaga LA, Ollero FJ, Nicolás MF, Rodrigues EP, et al. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics.* 2012;13:735.
- Gomes DF, Batista JSS, Torres AR, Andrade DS, Galii-Terasawa LV, Hungria M. Two-dimensional proteome reference map of *Rhizobium tropici* PRF 81 reveals several symbiotic determinants and strong resemblance with agrobacteria. *Proteomics.* 2012;12:1–5.
- Honma MA, Ausubel FM. *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the *nodD* symbiotic regulatory gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:8558–62.

28. Appelbaum ER, Thompson DV, Idler K, Chartrain N. *Rhizobium japonicum* USDA 191 has two *nodD* genes that differ in primary structure and function. J Bacteriol. 1998;170:12–20.
29. Relić B, Fellay R, Lewin A, Perret K, Price NPJ, Rochepeau P, et al. *nod* genes and Nod factors of *Rhizobium* species NGR 234. In: New horizons in nitrogen fixation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1993. p. 183–9.
30. Fellay R, Hanin M, Montorzi G, Frey J, Freiberg C, Golinowski W, et al. *nodD2* of *Rhizobium* sp. NGR234 is involved in the repression of the *nodABC* operon. Mol Microbiol. 1998;27:1039–50.
31. Spaink HP. Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and questions. Plant Mol Biol. 1992;20:977–86.
32. Österman J, Marsh J, Laine PK, Zeng Z, Alatalo E, Sullivan JT, et al. Genome sequencing of two *Neorhizobium galegae* strains reveals a *noeT* gene responsible for the unusual acetylation of the nodulation factors. BMC Genomics. 2014;15:500.
33. Demont N, Arbourel M, Mallet F, Promé D, Ferro M, Promé J-C, et al. The *Rhizobium melloti* regulatory *nodD3* and *syrM* genes control the synthesis of a particular class of nodulation factors N-acylated by ( $\omega$ -1)-hydroxylated fatty acids. EMBO J. 1994;13:2139–48.
34. Gomes DF, Ormeno-Orrillo E, Hungria M. Biodiversity, symbiotic efficiency and genomics of *Rhizobium tropici* and related species. In: de Bruijn F, editor. Biological nitrogen fixation. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2015. p. 747–56.
35. Inui H, Yamaguchi Y, Hirano S. Elicitor actions of N-acetylchitoooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. Biosci Biotechnol Biochem. 1997;61:975–8.
36. Liang Y, Cao Y, Tanaka K, Thibivilliers S, Wan J, Choi J, et al. Nonlegumes respond to rhizobial Nod factors by suppressing the innate immune rResponse. Science. 2013;341:1384–7.
37. Miransari M, Smith D. Rhizobial lipo-chitoooligosaccharides and gibberellins enhance barley (*Hordeum vulgare* L.) seed germination. Biotechnol. 2009;8:270–5.
38. Dall'Agnol RF, Ribeiro RA, Ormeño-Orrill E, Rogel MA, Delamuta JRM, Andrade DS, et al. *Rhizobium freirei*, a symbiont of *Phaseolus vulgaris* very effective in fixing nitrogen. Int J Syst Evol Microbiol. 2013;63:4167–73.
39. Hungria M, Phillips DA. Effects of a seed color mutation on rhizobial *nod*-gene-inducing flavonoids and nodulation in common bean. Mol Plant-Microbe Interact. 1993;6:418–22.
40. Beringer JE. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol. 1974;84:188–98.
41. Vincent JM. The modified Fahraeus slide technique. In: A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1970.
42. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. In: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor NY USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
43. Lamrabet Y, Bellogín RA, Cubo T, Espuny MR, Gil-Serrano A, Krishnan HB, et al. Mutation in GDP-fucose synthesis genes of *Sinorhizobium fredii* alters Nod factors and significantly decreases competitiveness to nodulate soybeans. Mol Plant-Microbe Interact. 1999;12:207–17.
44. Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene. 1994;145:69–73.
45. Simon R. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vivo constructed Tn5-Mob transposon. Mol Gen Genet. 1984;196:413–20.
46. Figurski DH, Helinski DR. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76:1648–52.
47. López-Baena FJ, Monreal JA, Pérez-Montaña F, Guasch-Vidal B, Bellogín RA, Vinardell JM, et al. The absence of Nops secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103 increases GmPR1 expression in Williams soybean. Mol Plant Microbe Interact. 2009;22:1445–54.
48. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res. 2002;30:e36.
49. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res. 2008;1:36.
50. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 2004;32(5):1792–7.
51. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Mol Biol Evol. 2000;17(4):540–52.
52. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Syst Biol. 2010;59(3):307–21.
53. Anisimova M, Gascuel O. Approximate likelihood ratio test for branches: a fast, accurate and powerful alternative. Syst Biol. 2006;55(4):539–52.
54. Chevenet F, Brun C, Banuls AL, Jacq B, Chisten R. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. BMC Bioinformatics. 2006;7:439.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH ARTICLE

Open Access



# RNA-seq analysis of the *Rhizobium tropici* CIAT 899 transcriptome shows similarities in the activation patterns of symbiotic genes in the presence of apigenin and salt

Francisco Pérez-Montaño<sup>1\*†</sup> , Pablo del Cerro<sup>1†</sup>, Irene Jiménez-Guerrero<sup>1</sup>, Francisco Javier López-Baena<sup>1</sup>, Maria Teresa Cubo<sup>1</sup>, Mariangela Hungria<sup>2</sup>, Manuel Megías<sup>1</sup> and Francisco Javier Ollero<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 establishes effective symbioses with several legume species, including *Phaseolus vulgaris* and *Leucaena leucocephala*. This bacterium synthesizes a large variety of nodulation factors in response to *nod*-gene inducing flavonoids and, surprisingly, also under salt stress conditions. The aim of this study was to identify differentially expressed genes in the presence of both inducer molecules, and analyze the promoter regions located upstream of these genes.

**Results:** Results obtained by RNA-seq analyses of CIAT 899 induced with apigenin, a *nod* gene-inducing flavonoid for this strain, or salt allowed the identification of 19 and 790 differentially expressed genes, respectively. Fifteen of these genes were up-regulated in both conditions and were involved in the synthesis of both Nod factors and indole-3-acetic acid. Transcription of these genes was presumably activated through binding of at least one of the five NodD proteins present in this strain to specific *nod* box promoter sequences when the bacterium was induced by both apigenin and salt. Finally, under saline conditions, many other transcriptional responses were detected, including an increase in the transcription of genes involved in trehalose catabolism, chemotaxis and protein secretion, as well as ribosomal genes, and a decrease in the transcription of genes involved in transmembrane transport.

**Conclusions:** To our knowledge this is the first time that a transcriptomic study shows that salt stress induces the expression of nodulation genes in the absence of flavonoids. Thus, in the presence of both nodulation inducer molecules, apigenin and salt, *R. tropici* CIAT 899 up-regulated the same set of symbiotic genes. It could be possible that the increases in the transcription levels of several genes related to nodulation under saline conditions could represent a strategy to establish symbiosis under abiotic stressing conditions.

**Keywords:** RNA-seq, *Rhizobium tropici* CIAT 899, Nodulation, Nod factors, Lipochitooligosaccharides, Apigenin, Salt stress

\* Correspondence: fperez@us.es

†Equal contributors

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida Reina Mercedes nº 6, 41012 Sevilla, Spain

Full list of author information is available at the end of the article





## Background

Rhizobia comprise a group of  $\alpha$ - and  $\beta$ -proteobacteria known for their ability to establish symbioses with several leguminous species. The rhizobium-legume interaction, characterized by an exchange of signal molecules from both partners, culminates in the formation of specific structures, called nodules, where biological nitrogen fixation takes place [1–5]. This molecular dialogue begins with the exudation of flavonoids by the host legume roots that are recognized by a LysR-type transcriptional regulator in the bacterium, the NodD protein, which triggers the expression of the so-called nodulation (*nod*) genes by binding to specific sequences, *nod* boxes (NB), located upstream of these genes. Their cognate enzymes are implied in the production of lipochitooligosaccharides, also known as Nod factors (NF), which in turns induce the formation of root nodule primordia and play an essential role in the infection process. A part from flavonoids, other rhizobial *nod* gene inducers have been identified, such as betaines [6], but they are required at higher concentrations [7].

*Rhizobium tropici* CIAT 899 (hereafter CIAT 899) is a broad host-range rhizobial strain isolated from tropical acid soils of South America that effectively nodulates several legumes, including *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum*, and *Leucaena leucocephala* [8, 9]. Main characteristics of this strain includes its high tolerance to several environmental stresses such as high temperature, acidity or salinity and its capacity to producing a large variety of NF in the presence of inducer flavonoids, such as apigenin [8, 10, 11]. It is remarkable that under acidity or salt stress conditions the synthesis of NF in CIAT 899 is also induced, resulting in increased diversity and concentration of these molecules in comparison to non-stressing conditions [12, 13]. Interestingly, Guasch-Vidal et al. [14] demonstrated that, even in the absence of flavonoids, CIAT 899 is able of synthesizing NF in the presence of high concentrations of salt, and the biological activity of these NF was confirmed. Moreover, the activation under salt stress is independent of NodD1 [14]. It has been reported that initial steps of rhizobium-legume symbioses are very sensitive to salt stress. However, the ability to form root nodules on their host legume species under saline conditions has been described for many rhizobia [15]. In general, rhizobial strains use distinct mechanisms for osmotic adaptation under salt stressing conditions during the free-lifestyle, such as the intracellular accumulation of osmolytes and specific ions, modification in cell surface polysaccharides or the synthesis of certain ABC membrane transporters [15, 16]. However, the synthesis of salt-induced NF has been only reported in CIAT 899.

Genome sequencing of CIAT 899 revealed five different *nodD* genes and three different *nodA* genes in the

symbiotic plasmid [17]. NodA catalyzes the transfer of the fatty acyl group from an acyl carrier protein to a terminal N-glucosamine residue previously deacetyled by NodB, on the chitin oligomer [18]. The *nodA1* gene is located adjacent to *nodD1*, whose encoded protein seems to be the major regulator of NF synthesis upon induction with flavonoid [19, 20] and together with *nodBC* compose an operon responsible for the synthesis of the NF core. The *nodA2* gene is part of a gene cluster including *hsnT* and *nodFE*, implied in unsaturated fatty acid incorporation into NF molecules and is located close to the *nodD2* gene. Curiously, a previous study [20] showed that, apparently, the activation of the expression of the *nodC* gene under salt stress is lower in a *nodD2* mutant than in both a *nodD1* mutant and the wild-type strain. Finally, *nodA3* is located downstream the *nodD3* gene but no other symbiotic-related genes have been identified in its vicinities [21].

The main objective of this study was to identify genes of CIAT 899 that are differentially expressed in the presence of the *nod*-gene inducer molecules apigenin and salt by RNA-seq analysis. In addition, the promoter regions of the symbiotic genes that were up-regulated in both conditions were studied to determine possible conserved promoter consensus motifs. Our results showed similar patterns of expression for the differentially expressed genes of the symbiotic plasmid replicon in the presence of both apigenin and salt, indicating that the NF synthesis was carried out following the same pathway, independently of the inducer molecule. The biological significance of the CIAT 899 transcriptomic response under salt condition was discussed.

## Results and discussion

### Identification of the differentially expressed genes

To identify differentially expressed genes in the presence of *nod* gene inducers six RNA-seq libraries were generated from CIAT 899 grown in the presence of apigenin (3.7  $\mu$ M), salt (300 mM) or under control conditions. Two independent biological experiments were carried out for each condition, being the general features of each run shown in Additional file 1. Libraries were sequenced and a range of 54 to 210 million reads were obtained in each condition, indicating that similar amounts of data were generated independently of the growth condition. Three different RNA-seq metrics for quality control, such as GC content, duplicate distribution, and the distribution of respective genetic coordinates, were performed (Additional file 1). Besides, before all subsequent analysis, a normalization of the quantitative data was performed to avoid statistical deviations due to differences in library and genetic sizes [22] (Additional file 1). Data set were validated by *qRT*-PCR (Table 1). In all cases, positive correlation degrees were obtained in fold-

**Table 1** RNA-seq data validation using *qRT-PCR*. Fold-change values were calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method and normalized to the reference gene RNA 16S for 20 differentially expressed genes. HP: gene that codes for a hypothetical protein

Gene name	Locus tag	Nucleotide range	RNA-seq		<i>qRT-PCR</i>	
			Apigenin	Salt	Apigenin	Salt
<i>araC1</i>	RTCIAT899_CH06050	1238211_1239707	1.81	6.98	1.60	3.49
<i>rpsL</i>	RTCIAT899_CH07390	1516428_1516799	-1.61	12.47	3.20	7.11
<i>araC2</i>	RTCIAT899_CH14150	2846615_2847376	-2.56	-8.00	1.97	2.04
<i>y4wE</i>	RTCIAT899_PB00575	97717_98829	8.58	12.17	15.35	16.68
<i>y4wF</i>	RTCIAT899_PB00570	96476_97504	3.20	7.11	12.05	10.04
<i>nodA2</i>	RTCIAT899_PB01095	192166_192756	10.30	9.81	13.90	17.00
<i>hsnT</i>	RTCIAT899_PB01100	192929_194854	7.27	5.94	25.67	12.50
<i>nodF</i>	RTCIAT899_PB01105	194950_195231	13.39	13.43	11.90	13.45
<i>nodE</i>	RTCIAT899_PB01110	195232_196440	10.37	11.94	16.74	13.78
<i>nodA1</i>	RTCIAT899_PB01300	235667_236257	6.69	12.00	14.18	17.83
<i>nodB</i>	RTCIAT899_PB01305	236254_236913	11.4	19.01	8.55	16.30
<i>nodC</i>	RTCIAT899_PB01310	236925_238283	6.69	12.00	11.39	15.94
<i>nodS</i>	RTCIAT899_PB01315	238201_238917	7.53	12.89	6.03	10.03
<i>nodU</i>	RTCIAT899_PB01320	238953_240680	5.39	10.18	15.29	22.86
<i>nodI</i>	RTCIAT899_PB01325	240668_241582	6.59	12.48	7.58	11.89
<i>nodJ</i>	RTCIAT899_PB01330	241586_242371	4.98	10.15	3.92	15.83
<i>nodH</i>	RTCIAT899_PB01340	242956_243705	3.09	7.6	14.80	17.02
HP	RTCIAT899_PB01545	281777_282742	4.27	14.37	8.88	18.11
<i>nodM</i>	RTCIAT899_PB02710	502220_504046	2.43	5.85	5.69	12.58
HP	RTCIAT899_PC04980	1059004_1060056	1.32	-4.22	1.14	-5.38

change values of the *qRT-PCR* and the RNA-seq data (Additional file 2).

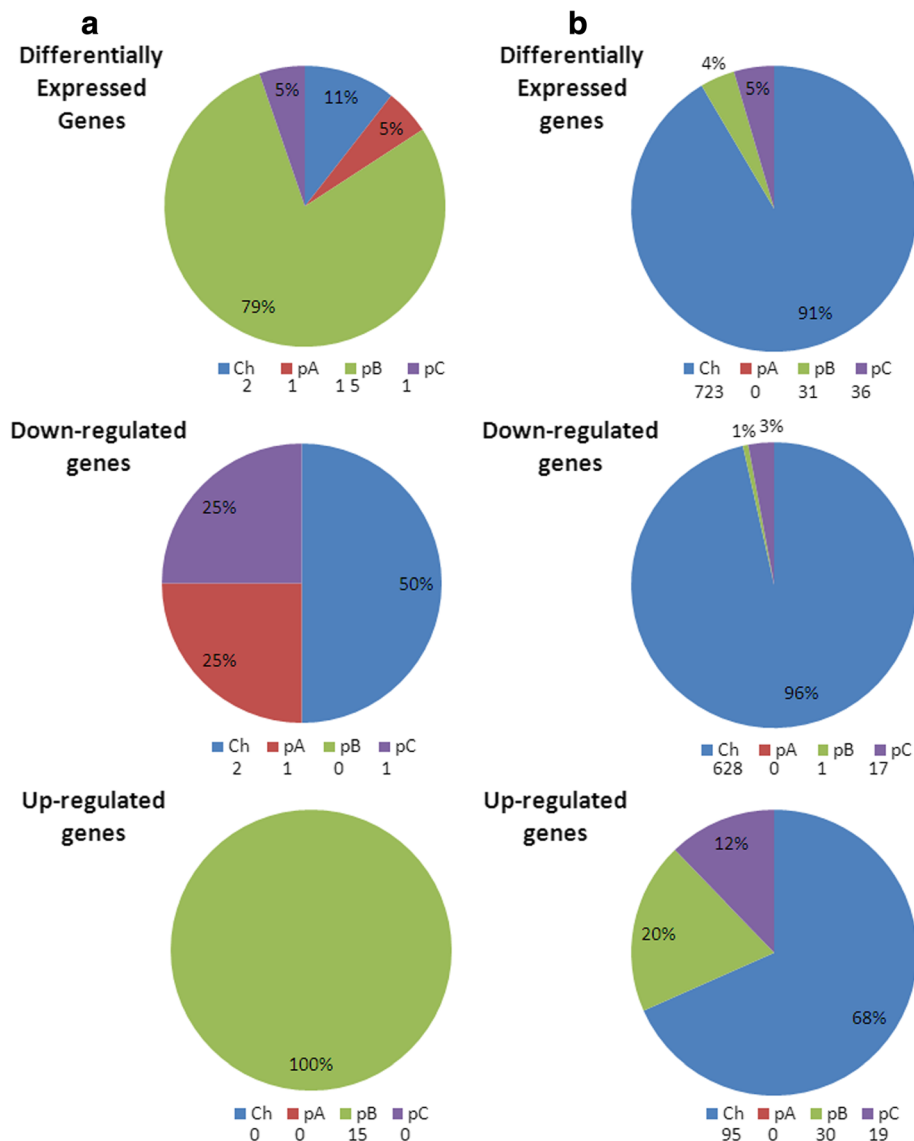
*R. tropici* CIAT 899 genome contains 6289 genes distributed among one chromosome (3672 CDS, GeneBank number CP004015.1) and three different plasmids: pRtrCIAT899a/pA (212 CDS, GeneBank number CP004016.1), pRtrCIAT899b/pB/symbiotic plasmid (500 CDS, GeneBank number CP004017.1), and pRtrCIAT899c/pC (1905 CDS, GeneBank number CP004018.1) [17]. Differentially expressed genes in each condition were obtained using the statistical software R. Results revealed 19 differentially expressed genes when the bacterium was grown in the presence of apigenin (0.3 % of the genome) and 790 genes when the bacterium was grown under salt stress condition (12.5 % of the genome). In the first case, 15 genes were up-regulated (78.9 %) and located in the symbiotic plasmid, while the other 4 were down-regulated and distributed in the other replicons: chromosome (2) and plasmids A (1) and C (3) (Fig. 1a). With respect to the cultures supplemented with salt, the majority of genes were down-regulated (646, 81.6 %); only 144 genes were over-expressed representing 18.4 % of the differentially expressed genes (Fig. 1b). Replicon distribution revealed that most of these genes (723; 95 up-regulated and 628 down-regulated) were located in the chromosome, some

in plasmid B (31; 30 up-regulated and 1 down-regulated) and the rest in plasmid C (36; 19 up-regulated and 17 down-regulated) (Fig. 1b).

Considering all genes, 17 were differentially expressed in both conditions, 15 were up-regulated and located in the symbiotic plasmid and the other two were down-regulated and located in the chromosome (Fig. 2). In addition, many other genes were differentially expressed only under saline conditions. This could be due to a survival strategy when the bacterium faces an abiotic stress. Similar results have been recently reported in *R. etli* CE3 under saline shock conditions, when 6.57 % of the genes were differentially expressed, most of them were located in the chromosome [16].

#### Functions associated to responses to *nod* gene-inducing molecules

CIAT 899 is able to synthesize NF not only upon induction with flavonoid but also under salt stress [14]. To evaluate which functions are intrinsic to each inducing condition, a functional enrichment was carried out to assign the statistically over-represented biological processes (activated or repressed) using data available at the Uniprot database (Gene Ontology, GO). Results are summarized in Additional file 3. As expected, when

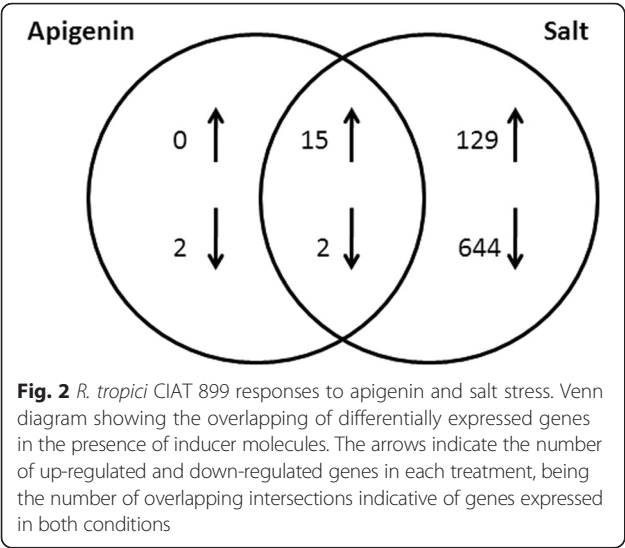


**Fig. 1** Distribution of differentially expressed genes. Percentage and location of differentially expressed genes (up- and down-regulated) in *R. tropici* CIAT 899 induced with apigenin (a) or salt (b). Ch: chromosome, pA: pRtrCIAT899a, pB: pRtrCIAT899b, pC: pRtrCIAT899c. The number of differentially expressed genes is indicated under each replicon

induced with apigenin, some of the differentially expressed genes were involved in nodulation and oligosaccharide transport (Fig. 3a). The same biological processes were also activated under salt stress. However, the presence of salt also induced many other biological processes such as nitrogen fixation, chemotaxis, carbohydrate metabolism, transcription, translation, conjugation and ATP biosynthesis (Fig. 3b). RNA-seq and proteomics studies performed on other rhizobial strains under saline and heat shock conditions revealed that many of these processes are also being altered [16, 23, 24].

#### Apigenin activates the transcription of *nod* gene operons and the synthesis of indole-3-acetic acid

The CIAT 899 genome harbors five different *nod* genes and three different *nodA* genes in the symbiotic plasmid [17]. Are the *nodA1BC* and the *nodA2FE* operons and the *nodA3* gene of CIAT 899 activated by apigenin? Transcriptomic analysis revealed that four sets of genes were significantly up-regulated in the symbiotic plasmid under this condition. Two of them corresponded to the *nodA1* and *nodA2* operons, the third, located adjacent to the *nodD5* gene, was involved in the synthesis of the phytohormone indole-3-acetic acid (IAA) [21], and the



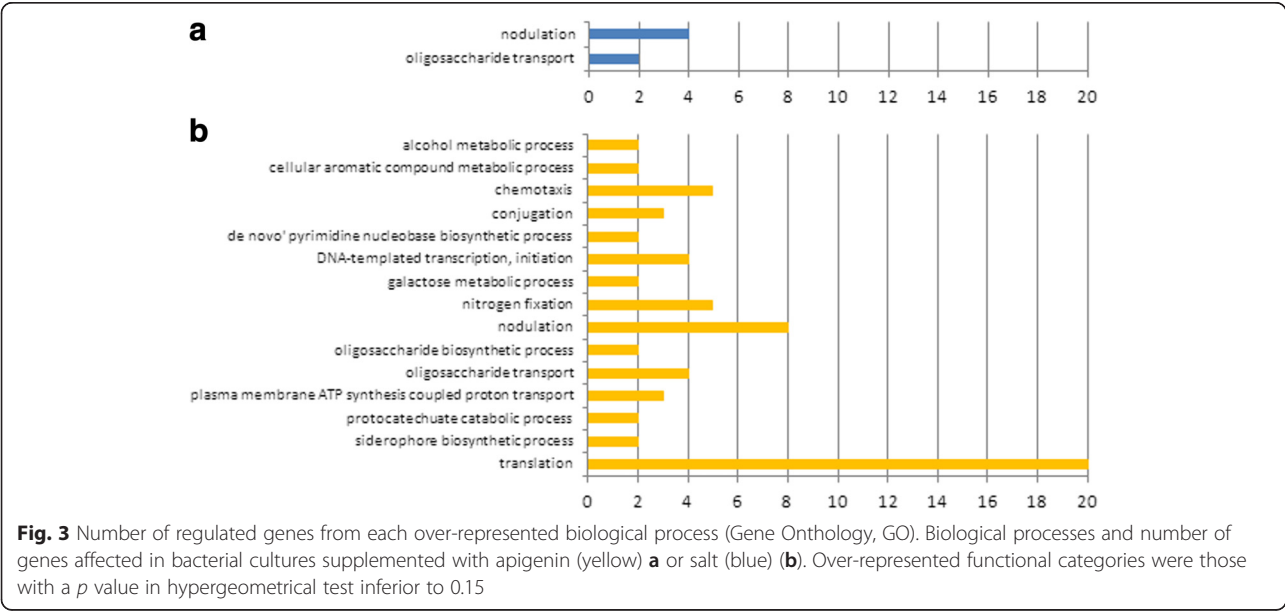
last set of genes coded for proteins with unknown functions (Fig. 4, Additional file 4). Therefore, at least two main biological processes were activated in CIAT 899 when induced with apigenin: the synthesis of NF (*nodA1BCSUIJHPQ1Q2* and *nodA2hsnTnodFE* genes) and the production of IAA (*y4wEF* genes). Of special interest is the elucidation of the symbiotic role of the set of genes with unknown function activated with apigenin (RTCIAT899\_PB01550 and RTCIAT899\_PB01545). In summary, these results indicate that when induced with apigenin, CIAT 899 is able to synthesize NF that will induce root nodule primordia formation, as well as phytohormones that will favor root development. This is consistent with a recent study in which an increase in the production of IAA is reported when CIAT 899 is

grown in cultures supplemented with both apigenin and salt [20]. A similar regulation cascade involving NodD1 and flavonoids has been reported in *Sinorhizobium fredii* NGR234 for the synthesis of IAA [25].

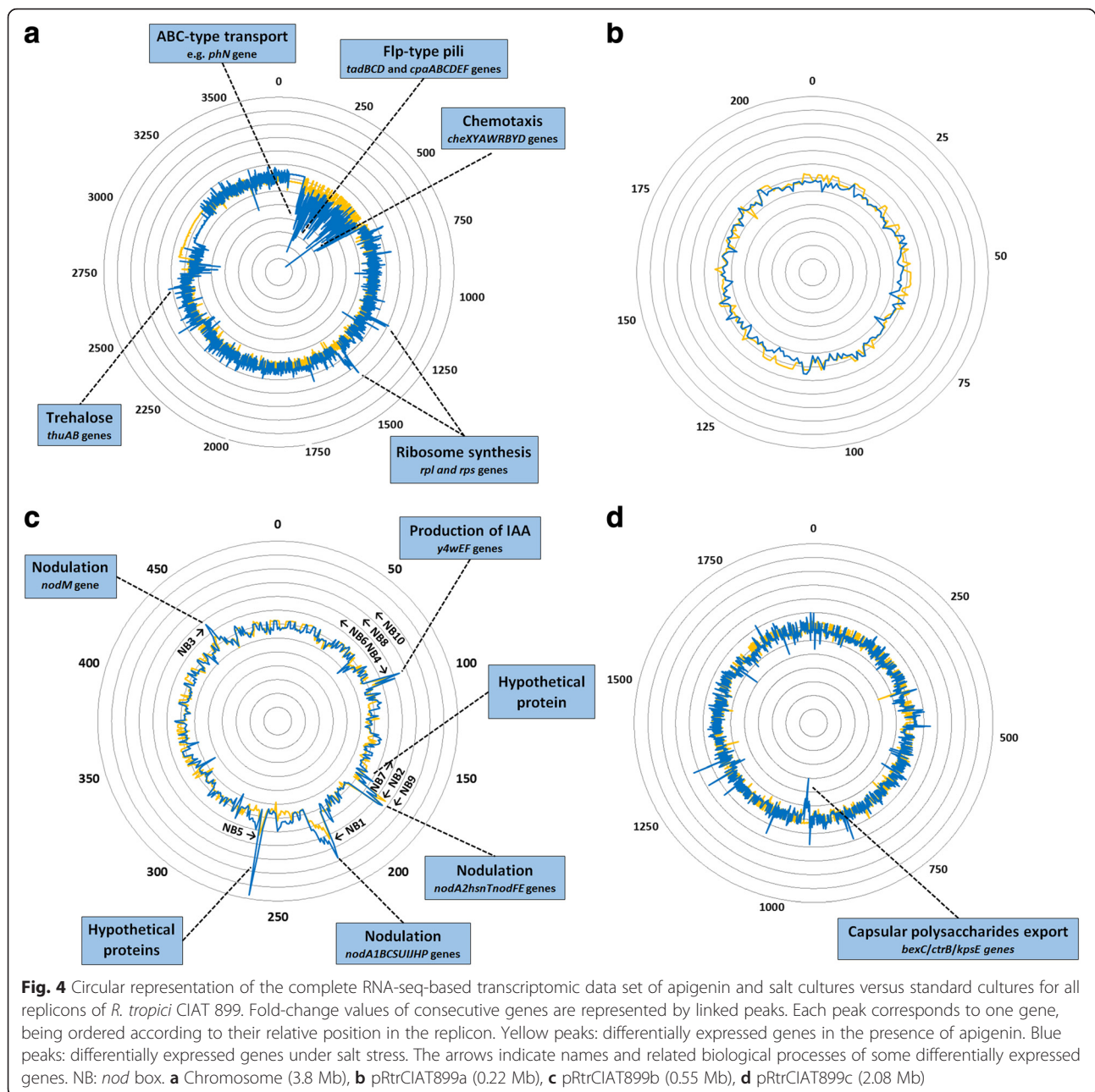
**Common responses: synthesis of nodulation molecules and identification of *nod* boxes**

As previously mentioned in the introduction, the capacity to nodulate under salt stress conditions has been described for many rhizobial strains [15]. However, the salt-regulated production of NF has been only reported for *R. tropici* CIAT 899. Are the CIAT 899 genetic pathways to synthesize NF under salt stress similar to those described for apigenin? The RNA-seq analysis shown in this work indicated that although the pattern of symbiotic gene activation in the presence of salt was similar to that obtained with apigenin (Fig. 4, Additional files 4 and 5), slightly higher expressions of *nod* genes, with an emphasis on the *nodA1* operon, was observed when the bacterium was induced with salt (Table 2). Moreover, under salt stress *nodM* and a gene that codes for a flavine mononucleotide reductase (RTCIAT899\_PB02705) were significantly up-regulated. Although the up-regulation of *nodM* was not detected in the RNA-seq of CIAT 899 grown in the presence of apigenin, it was detected in the *qRT*-PCR analysis (5.69 fold-change) (Table 1).

All these results indicate that the transcription of the CIAT 899 *nod* genes seems to respond similarly to the presence of either apigenin or salt (Table 2). The question that remains unclear is whether the responses observed follow the common NodD activation pathway. To answer this question, an *in silico* analysis to detect promoter motifs was conducted using consensus sequences







of *nod* boxes (NB) present in other related rhizobial strains. Thus, ten potential NB were identified, all sharing the AT-N<sub>11</sub>-AT-N<sub>7</sub>-AT-N<sub>2</sub>-A-N<sub>4</sub>-AT-N<sub>2</sub>-ATT-N-T sequence consensus (Fig. 5). Four of these NB were situated upstream of the four different sets of genes up-regulated under both inducing conditions, namely, the operons *nodA1BCSUIIHPQ1Q2* (NB1), *nodA2hsnT-nodFE* (NB2), *y4wEF* operon (NB4) and the *nodM* gene (NB3) (Table 3, Additional files 4 and 5). Interestingly, two of the genes previously identified as up-regulated with apigenin (RTCIAT899\_PB01550 and RTCIAT899\_PB01545) were also induced with salt. The expression of

one of these genes (RTCIAT899\_PB01545) was validated by *qRT*-PCR in the presence of both apigenin (8.88-fold) and salt (18.11-fold) (Table 1). This gene expression, combined with the fact that both genes were located downstream NB5, indicate that these hypothetical proteins could be playing a role in the symbiotic process (Table 3, Additional files 4 and 5). Finally, NB7 was located upstream a gene (RTCIAT899\_PB01055) up-regulated with salt, but not with apigenin (Table 3, Additional file 5).

Altogether, these results suggest that when CIAT 899 was induced either by apigenin or salt, genes related to

**Table 2** Fold-change expression values of the *R. tropici* CIAT 899 *nod* genes on the RNA-seq analysis. Fold-change values followed by an asterisk (\*) are significantly over-expressed

Gene name/Locus tag	Apigenin	Salt
<i>nodD1</i> /RTCIAT899_PB01295	1.23	1.04
<i>nodD2</i> /RTCIAT899_PB01070	-1.25	3.01
<i>nodD3</i> /RTCIAT899_PB00640	-1.21	2.1
<i>nodD4</i> /RTCIAT899_PB01560	1.09	1.16
<i>nodD5</i> /RTCIAT899_PB00560	-1.12	-1.09
<i>nodA1</i> /RTCIAT899_PB01300	8.73*	13.66*
<i>nodB</i> /RTCIAT899_PB01305	11.4*	19.01*
<i>nodC</i> /RTCIAT899_PB01310	6.69*	12*
<i>nodS</i> /RTCIAT899_PB01315	7.53*	12.89*
<i>nodU</i> /RTCIAT899_PB01320	5.39*	10.18*
<i>nodI</i> /RTCIAT899_PB01325	6.59*	12.48*
<i>nodJ</i> /RTCIAT899_PB01330	4.98*	10.15*
<i>nodH</i> /RTCIAT899_PB01340	3.09	7.6*
<i>nodP</i> /RTCIAT899_PB01345	2.78	6.08*
<i>nodQ1</i> /RTCIAT899_PB01350	3.25	6.39*
<i>nodQ2</i> /RTCIAT899_PB01355	1.28	2.54
<i>nodA2</i> /RTCIAT899_PB01095	10.3*	9.81*
<i>hnsT</i> /RTCIAT899_PB01100	7.27*	5.94*
<i>nodF</i> /RTCIAT899_PB01105	13.39*	13.43*
<i>nodE</i> /RTCIAT899_PB01110	10.37*	11.94*
<i>nodA3</i> /RTCIAT899_PB00645	1.15	3.36
<i>nodM</i> /RTCIAT899_PB02710	2.43	5.85*

the synthesis of NF and IAA were activated through the recognition of specific *nod* boxes (Table 2). In *S. fredii* NGR234, nineteen *nod* boxes have been identified and eighteen of them were inducible with flavonoids via NodD1. In addition, *S. fredii* NGR234 carries two copies of the *nodD* gene and four of these *nod* boxes are controlled by NodD2 [26].

### Salt stress response: a pathway towards symbiosis?

Chromosomal RNA-seq analysis showed, under salt stress, an up-regulation of genes whose products are implied in the formation of ribosomes (both 30 and 50S ribosomal proteins coded by the *rpl* and *rps* genes, respectively) and in the utilization of the disaccharide trehalose (*thuAB* genes), an osmotic stabilizer [27, 28]. Instead, down-regulation was detected in genes that encode proteins involved in chemotaxis (*cheXYAWRBYD* genes) [29], formation of Flp-type *pili* (type IVb protein secretion system; *tadBCD* and *cpaABCDEF* genes) [30], or ABC-type transport (several genes: e.g. *phn* genes). In addition, a set of genes located in pRtrCIAT899c and involved in the export of capsular polysaccharide across the inner membrane (genes of the family *bexC/ctrB/kpsE*) was also down-regulated (Fig. 4, Additional file 5) [31].

Therefore, the global response of CIAT 899 to salt stress indicates that the strain drastically reduces the uptake of molecules and the energy consumption, reducing the ATP-dependent transport of the ABC-type permeases. However, under saline shock conditions *R. etli* CE3 over-expresses genes that code for many ABC transporters and increases the transcription levels of genes related to the biosynthesis of trehalose [16]. Nevertheless, in CIAT 899 an up-regulation of genes involved in the degradation of trehalose was detected. The explanation could be that this osmolyte tends to accumulate during symbiosis, but it is toxic to plants. To solve this problem, bacteria would produce trehalose-degrading enzymes [32]. These observations in CIAT 899, combined with the production of NF and IAA under salt stress, make us formulate the next question: could the promotion of the symbiosis represent a strategy of CIAT 899 to ensure nodulation under this abiotic stress condition? To shed light on this question we have analyzed the changes in biological processes under saline conditions. First, we observed an enhancement in ribosomal synthesis, which could be related to a translation increase due



**Fig. 5** Alignment of NB sequences from *R. tropici* CIAT 899. Software fuzznuc of the EMBOSS package was used to identify *nod* box-like sequences. Hits were selected based on their conservation to previously identified NB sequences. Searching of these consensus sequences was carried out on the whole genome of *R. tropici* CIAT 899. DNA sequences were aligned using the ClustalW program and manipulated with Boxshade at EMBnet. Dark and gray boxes indicate identical and similar nucleotides, respectively. Promoter consensus motifs are marked with an asterisk on the consensus line

**Table 3** Up-regulation of the *R. tropici* CIAT 899 pRtCIAT899b genes located downstream *nod* boxes. Transcriptional activation (4-fold induction with respect to control cultures) of several *nod* box controlled operons was demonstrated by RNA-seq data in the presence of both inducer molecules. HP: gene that codes for a hypothetical protein

NB (Distance)	Cds number/Locus tag/Gene name	Putative function	Fold changeapigenin	Fold changesalt
1 (270 pb)	cds216 to 227/RTCIAT899_PB01300 to RTCIAT899_PB01345/ <i>nodABCSUIJHPQ1Q2</i>	NF production	8.73 to 1.28	13.66 to 2.54
2 (250 pb)	cds177 to 180/RTCIAT899_PB01095 to RTCIAT899_PB01110/ <i>nodA2hsnTnodFE</i>	NF production	10.3 to 10.37	9.81 to 11.94
3 (180 pb)	cds450 to 449/RTCIAT899_PB02710 to RTCIAT899_PB02705/ <i>nodM</i>	NF production	2.43 to 3.18	5.85 to 8.49
4 (680 pb)	cds95 to 93/RTCIAT899_PB00575 to RTCIAT899_PB00565/ <i>y4wEF</i>	Synthesis of IAA	8.57 to 1.63	12.17 to 3.27
5 (38 pb)	cds263 to 262/RTCIAT899_PB01550 to RTCIAT899_PB01545/HP	Unknown	6.75 to 4.26	28.65 to 14.37
6 (70 pb)	cds61 to 62/RTCIAT899_PB00370 to RTCIAT899_PB00375/HP	Unknown	1.80 to 2.11	2.17 to 1.64
7 (191 pb)	cds170/RTCIAT899_PB01055/HP	Unknown	1.18	5.68
8 (470 pb)	cds81/RTCIAT899_PB00495/HP	Unknown	−1.05	2.58
9 (979 pb)	cds173/RTCIAT899_PB01570/ <i>nodD2</i>	Transcriptional regulation	−1.25	3.01
10 (292 pb)	cds89/RTCIAT899_PB00540/HP <sup>a</sup>	Unknown	1.13	−1.44

<sup>a</sup>The transcriptional orientation of this gene is opposite to the NB10 sequence orientation

to an increase in the transcription of nodulation genes (a stronger *nod* gene up-regulation was detected in salt stress conditions). Second, general protein secretion systems and surface polysaccharides seem to play an important role in bacterial fitness under stressing environmental conditions, such as high salinity or temperature [16, 23, 24]. However, in CIAT 899 we observed inhibition under salt stress. Remarkably, both cellular components can also be considered microbe-associated molecular patterns (MAMP), which trigger the plant immune system [33]. Other rhizobial strains in the presence of inducer flavonoids modify their surface molecules to avoid plant immune responses, thereby promoting nodulation [34]. Finally, when colonizing legume roots many rhizobia form micro-colonies or biofilms. In some of these rhizobia common *nod* genes are required for the development of these structures, since the biofilm matrix is composed in part by NF [35, 36]. Thus, in CIAT 899, the synthesis of NF and the down-regulation of chemotaxis genes detected under saline conditions could be related to the formation of a symbiotic biofilm. In summary (Fig. 6), these results suggest that in the presence of salt CIAT 899 could strategically increase the transcription of nodulation genes and the synthesis of NF to increase the chances to establish symbiosis even under abiotic stressing conditions.

## Conclusions

Our work shows that in the presence of the nodulation inducing molecules apigenin (3.7  $\mu$ M) and salt (300 mM), *R. tropici* CIAT 899 increases the transcription of the same set of genes (slightly higher expression upon salt

treatment), whose encoded proteins are involved in the synthesis of symbiotic molecules. Besides, the salt-dependent production of these symbiotic molecules could be a CIAT 899 strategy to ensure nodulation under salt stress.

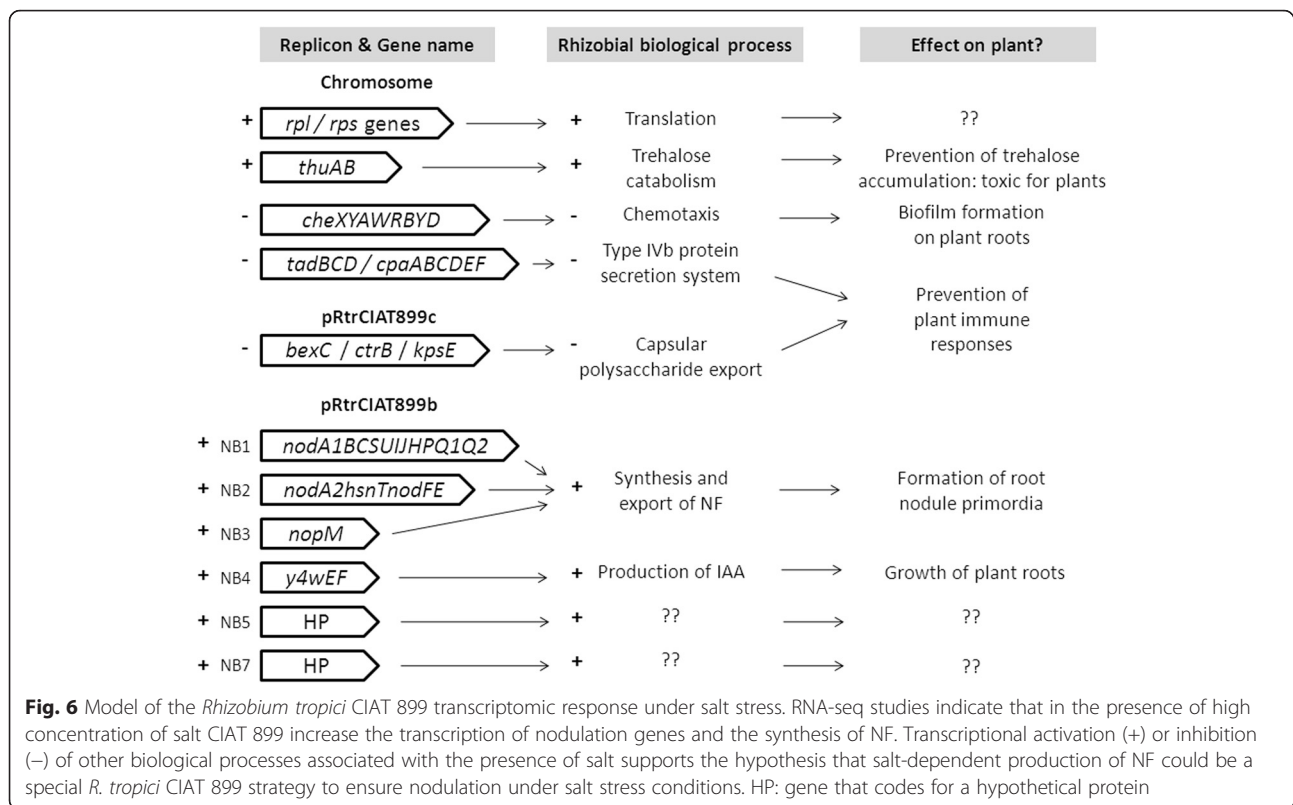
## Methods

### Culture conditions and RNA extraction

*R. tropici* CIAT 899 was grown for 72 h at 28 °C on tryptone yeast (TY) medium [37], supplemented with apigenin 3.7  $\mu$ M or NaCl 300 mM when necessary (induction of the synthesis of NF) [14, 20]. Total RNA was isolated using a High Pure RNA Isolation Kit (Roche), according to the manufacturer's instructions. Verification of the amount and quality of total RNA samples was carried out using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and a Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen). Two independent total RNA extractions were obtained for each condition.

### Quantitative reverse transcription PCR

Result obtained in the RNA-seq analysis were validated by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) of 20 selected genes, which represented differentially and non-differentially expressed genes in the presence of apigenin and salt. Total RNA was isolated using a High Pure RNA Isolation Kit (Roche) and RNAase Free DNA Set (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. This (DNA-free) RNA was reverse transcribed into cDNA using a QuantiTec Reverse Transcription Kit (Qiagen). Quantitative PCR was performed using a LightCycler 480 (Roche) with the following conditions:



95 °C, 10 min; 95 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; 72 °C, 20 s; forty cycles, followed by the melting curve profile from 60 to 95 °C to verify the specificity of the reaction. The *R. tropici* CIAT 899 16S rRNA gene was used as an internal control to normalize gene expression. The fold-changes of two biological samples with three technical replicates of each condition were obtained using the  $\Delta\Delta C_t$  method [38]. Selected genes and primers are listed in Additional file 2.

### RNA sequencing

Ribosomal RNA was depleted using a MICROB Express Bacterial mRNA Purification kit (Ambion), following the manufacturer's protocol. Integrity and quality of the ribosomal depleted RNA was checked with Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). RNA sequencing was carried out by Sistemas Genómicos ([https://www.sistemasgenomicos.com/web\\_sg/](https://www.sistemasgenomicos.com/web_sg/)) with the Next Generation Sequence (NGS) platform Illumina using the Illumina HiSeq 2000 sequencing instrument (Illumina). Ribosomal-depleted samples were used to generate whole transcriptome libraries following the manufacturer's recommendations for sequencing on this NGS platform. Amplified cDNA quality was analyzed by the Bioanalyzer 2100 DNA 1000 kit (Agilent Technologies) and quantified using the Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen).

### Mapping of the RNA-seq data

The initial whole transcriptome paired-end reads obtained from sequencing were mapped against the latest version of the *R. tropici* CIAT 899 genome ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Rhizobium\\_tropici\\_CIAT\\_899](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Rhizobium_tropici_CIAT_899)) using the the Life Technologies mapping algorithm version 1.3 (<http://www.lifetechnologies.com/>). Low-quality reads were eliminated using Picard Tools software version 1.83, remaining only high quality reads.

### Assessment of differentially expressed genes

Gene prediction was estimated using the cufflinks method [39] and the expression levels were calculated using the htseq software, version 0.5.4p3 [40]. This method eliminates multimapped reads, considering only unique reads for the gene expression estimation. The edge method version 3.2.4 was applied for differential expression analysis among conditions [41]. This method uses a Poisson model to estimate the variance of the RNA-seq data for differential expressions, and relies on different normalized processes based on depth global samples, CG composition and length of genes. Differentially expressed genes were established in those genes with a fold-change lower or higher than –4 or 4, respectively, with a *p* value adjust to 0.7.



### Functional categorization of genes

In order to assign the statistical over-represented functional categories in the presence of both *nod* gene-inducing molecules, an enrichment functional study was performed. Thus, genes were annotated using Uniprot databases and a hypergeometrical test using all genes as background and differential gene expression as interesting group of genes was applied [42]. This statistical test calculates the statistical significance using *p* value [43], being in this case evaluated the significance of functional categories. Those functional categories (biological processes) with a *p* value inferior to 0.15 were considered over-represented.

### Consensus motifs

The program fuzznuc of the EMBOS package was used to identify *nod* box-like sequences. Hits were selected based on their conservation to known NB sequences [44, 45]. Thus, the search pattern used was at[ct][cg][ag]n(5)[tc][-ga][ga]atn(7)at[ct]caacaatc[ga]atttncn(2)at, allowing a maximum of 3 mismatches. Searching of these consensus sequences was carried out on the whole genome of CIAT 899. Alignment of the NB sequences was performed using ClustalW at EMBnet.

### RNA-seq data accession number

The RNA-seq data discussed in this publication have been deposited in the Sequence Read Archive of NCBI under the accession number SRP067561.

### Additional files

**Additional file 1:** General features of the total sequenced and mapped reads. Reads were mapped using a Bayesian inference using Cufflinks v2.11 software. Worst quality reads were removed by means of Picard Tools (See the Material and Methods section) (PDF 185 kb)

**Additional file 2:** Correlation degrees between RNA-Seq and qRT-PCR experiments. qRT-PCR and RNA-seq fold-change values of 20 selected genes were represented in a graphic to obtain the correlation degrees in both conditions. Genes and primer sequences are shown (XLS 38 kb)

**Additional file 3:** Functions (Gene Ontology, GO) associated to *R. tropici* CIAT 899 responses to apigenin and salt. A hypergeometric test performed in the platform R (See the Material and Methods section) was carried out to assign the statistical over-represented functional categories in presence of both *nod* gene inducing molecules (XLSX 11 kb)

**Additional file 4:** Whole genome differential expression in *R. tropici* CIAT 899 cultures supplemented with apigenin. Python and R were used to study differential expression among sample groups. Algorithm proposed by DESeq2 was used for gene differential expression, taking as a dispersion model a negative binomial distribution. Differentially expressed genes were established in those genes with a fold change lower or higher than -4 or 4, respectively (See the Material and Methods section). Fold-change values are represented by bars. Each bar corresponds to one gene and they are ordered according to their relative position in each replicon. Blue bars: genes not differentially expressed. Yellow bars: differentially expressed genes. The arrows indicate names of some differentially expressed genes. Ch: chromosome, pC: pRtrCIAT899c, pB: pRtrCIAT899b, pA: pRtrCIAT899a (XLSX 750 kb)

**Additional file 5:** Whole genome differential expression in *R. tropici* CIAT 899 cultures supplemented with salt. Python and R were used to study differential expression among sample groups. Algorithm proposed by DESeq2 was used for gene differential expression, taking as a dispersion model a negative binomial distribution. Differentially expressed genes were established in those genes with a fold change lower or higher than -4 or 4, respectively (See the Material and Methods section). Fold change values are represented by bars. Each bar corresponds to one gene and they are ordered according to their relative position in each replicon. Blue bars: genes not differentially expressed. Yellow bars: differentially expressed genes. The arrows indicate names of some differentially expressed genes. Ch: chromosome, pC: pRtrCIAT899c, pB: pRtrCIAT899b, pA: pRtrCIAT899a (XLSX 654 kb)

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

MH, MM and FJO conceived and designed the experiments. PDC, IJG and FPM performed the experiments. PDC, IJG and FPM analyzed the data. FJLB, MM and FJO contributed with reagents/materials/analysis tools. FJLB, TC, FJO and FPM wrote the paper. All authors have read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

We would like to thank the Ministerio de Economía y Competitividad of the Spanish government (project AGL2012-), the Junta de Andalucía (project P11-CVI-7050) and the University of Seville (VPPI) for funding this work. Mr. Del Cerro is recipient of an FPU fellowship of the Ministerio de Economía y Competitividad. Dr. Pérez-Montaño is recipient of a post-doctoral contract of the VPPI of the University of Seville. Dr. Hungria is a research fellow of CNPq-Brazil. We also would like to acknowledge Dr. Juan Carlos Treviño (Sistemas Genómicos S.L.) for his help during all the bioinformatic analysis and Dr. Jonathan Trow (Sequence Read Archive from NCBI) for his technical assistance during the RNA-seq data submission. We thank the Servicio General de Biología of the CITIUS from the University of Seville for allowing us to use their laboratory equipment.

### Author details

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida Reina Mercedes nº 6, 41012 Sevilla, Spain. <sup>2</sup>Embrapa Soja, Londrina, Paraná, Brazil.

Received: 15 October 2015 Accepted: 25 February 2016

Published online: 08 March 2016

### References

- Broughton WJ, Jabbouri S, Perret X. Keys to symbiotic harmony. *J Bacteriol.* 2000;182:5641–52.
- Oldroyd GE. Speak, friend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11:252–63.
- Black M, Moolhuijzen P, Chapman B, Barrero R, Howieson J, Hungria M, et al. The genetics of symbiotic nitrogen fixation: comparative genomics of 14 rhizobia strains by resolution of protein clusters. *Genes.* 2012;3:138–66.
- van Hameren B, Hayashi S, Gresshoff PM, Ferguson BJ. Advances in the identification of novel factors required in soybean nodulation, a process critical to sustainable agriculture and food security. *J Plant Biol Soil Health.* 2013;1:6.
- Hungria M, Phillips DA. Effects of a seed color mutation on rhizobial *nod*-gene-inducing flavonoids and nodulation in common bean. *Mol Plant-Microbe Interact.* 1993;6:418–22.
- Phillips DA, Joseph CM, Maxwell CA. Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 1992;99:1526–31.
- Cooper JE. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol.* 2007;103:1355–65.
- Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and *leucaena* sp. Trees. *Int J Syst Bacteriol.* 1991;41:417–26.

9. Gomes DF, Ormeño-Orrillo E, Hungria M. Biodiversity, symbiotic efficiency and genomics of *Rhizobium tropici* and related species. In: De Bruijn F, editor. Biological nitrogen fixation. vol.2. Chapter 74. New Jersey: Wiley; 2015. p. 747–56.
10. Poupot R, Martínez-Romero E, Promé JC. Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing an *N*-methyl-*N*-acetylglucosaminyl terminus. Biochemistry. 1993;32:10430–5.
11. García MLJ, Dunlap J, Loh J, Stacey G. Phenotypic characterization and regulation of the *nolA* gene of *Bradyrhizobium japonicum*. Mol Plant Microbe Interact. 1996;9:625–35.
12. Estévez J, Soria-Díaz ME, de Córdoba FF, Morón B, Manyani H, Gil A, et al. Different and new Nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899 following Na<sup>+</sup> stress. FEMS Microbiol Lett. 2009;293:220–31.
13. Morón B, Soria-Díaz ME, Ault J, Verroios G, Noreen S, Rodríguez-Navarro DN, et al. Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. Chem Biol. 2005;12:1029–40.
14. Guasch-Vidal B, Estévez J, Dardanelli MS, Soria-Díaz ME, de Córdoba FF, Balog CI, et al. High NaCl concentrations induce the *nod* genes of *rhizobium tropici* CIAT899 in the absence of flavonoid inducers. Mol Plant Microbe Interact. 2013;26:451–60.
15. Zahran HH. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiol Mol Biol Rev. 1999;63:968–89.
16. López-Leal G, Tabche ML, Castillo-Ramírez S, Mendoza-Vargas A, Ramírez-Romero MA, Dávila G. RNA-Seq analysis of the multipartite genome of *Rhizobium etli* CE3 shows different replicon contributions under heat and saline shock. BMC Genomics. 2014;15:770.
17. Ormeño-Orrillo E, Menna P, Gonzaga LA, Ollero FJ, Nicolas MF, Rodrigues EP, et al. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *rhizobium tropici* CIAT 899 and *rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). BMC Genomics. 2012; 13:735.
18. John M, Röhring H, Schmidt J, Wienecke U, Schell J. *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitoooligosaccharide deacetylase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:625–9.
19. van Rhijn PJ, Feys B, Verreth C, Vanderleyden J. Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT899 and BR816. J Bacteriol. 1993;175:438–47.
20. del Cerro P, Rolla-Santos AAP, Gomes DF, Marks BB, Pérez-Montaño F, Rodríguez-Carvajal MA, et al. Regulatory *nodD1* and *nodD2* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 and their roles in the early stages of molecular signaling and host-legume nodulation. BMC Genomics. 2015;16:251.
21. del Cerro P, Rolla-Santos AAP, Gomes DF, Marks BB, Espuny MR, P Rodríguez-Carvajal MA, et al. Opening the "black box" of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899. BMC Genomics. 2015;16:864.
22. Hansen KD, Irizarry RA, Wu Z. Removing technical variability in RNA-seq data using conditional quantile normalization. Biostatistics. 2012;3:204–16.
23. Alexandre A, Laranjo M, Oliveira S. Global transcriptional response to heat shock of the legume symbiont *mesorhizobium loti* MAFF303099 comprises extensive gene downregulation. DNA Res. 2014;21:195–206.
24. Gomes DF, Batista JSS, Schiavon AL, Andrade DS, Hungria M. Proteomic profiling of *Rhizobium tropici* PRF 81: identification of conserved and specific responses to heat stress. BMC Microbiol. 2012;12:84.
25. Theunis M, Kobayashi H, Broughton WJ, Prinsen E. Flavonoids, NodD1, NodD2, and *nod*-box NB15 modulate expression of the *y4wEFG* locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. Strain NGR234. Mol Plant Microbe Interact. 2004;17:1153–61.
26. Kobayashi H, Naciri-Graven Y, Broughton WJ, Perret X. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod*-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. Mol Microbiol. 2004;51:335–47.
27. Ampomah OY, Avetisyan A, Hansen E, Svenson J, Huser T, Jensen JB, et al. The *thuEFGKAB* operon of rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens* codes for transport of trehalose, maltitol, and isomers of sucrose and their assimilation through the formation of their 3-keto derivatives. J Bacteriol. 2013;195:3797–807.
28. Strøm AR, Kaasen I. Trehalose metabolism in *escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. Mol Microbiol. 1993;8: 205–10.
29. Park SY, Chao X, Gonzalez-Bonet G, Beel BD, Bilwes AM, Crane BR. Structure and function of an unusual family of protein phosphatases: the bacterial chemotaxis proteins CheC and CheX. Mol Cell. 2004;16:563–74.
30. Zatakia HM, Nelson CE, Syed UJ, Scharf BE. ExpR coordinates the expression of symbiotically important, bundle-forming Flp pili with quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. Appl Environ Microbiol. 2014;80:2429–39.
31. Kroll JS, Loynds B, Brophy LN, Moxon ER. The *bex* locus in encapsulated *Haemophilus influenzae*: a chromosomal region involved in capsule polysaccharide export. Mol Microbiol. 1990;4:1853–62.
32. Boboye B. Degradation of trehalose by rhizobia and characteristics of a trehalose-degrading enzyme isolated from *Rhizobium* species NGR234. J Appl Microbiol. 2004;97:256–61.
33. Jones JD, Dangl JL. The plant immune system. Nature. 2006;444:323–9.
34. Vinardell JM, Ollero FJ, Hidalgo A, López-Baena FJ, Medina C, Ivanov-Vangelov K, et al. NodR regulates diverse symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. Mol Plant Microbe Interact. 2004;17:676–85.
35. Fujishige NA, Lum MR, De Hoff PL, Whitelegge JP, Faulk KF, Hirsch AM. *Rhizobium* common *nod* genes are required for biofilm formation. Mol Microbiol. 2008;67:504–15.
36. Pérez-Montaño F, Jiménez-Guerrero I, Del Cerro P, Baena-Ropero I, López-Baena FJ, Ollero FJ, et al. The symbiotic biofilm of *Sinorhizobium fredii* SMH12, necessary for successful colonization and symbiosis of *glycine max* cv osumi, is regulated by quorum sensing systems and inducing flavonoids via NodD1. PLoS One. 2014;9, e105901.
37. Beringer JE. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol. 1974;84:188–98.
38. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001;29, e45.
39. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. Nat Biotechnol. 2010;28:511–5.
40. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol. 2010;11:R106.
41. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. EdgeR a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics. 2010;26:139–40.
42. Huang DW, Sherman BT. Lempicki. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res. 2009;37:1–13.
43. Rice JA. Mathematical Statistics and Data Analysis. 2007; (Third ed.). In: USA: Duxbury Press. p.42.
44. Sousa C, Folch JL, Boloix P, Megías M, Nava N, Quinto C. A *Rhizobium tropici* DNA region carrying the amino-terminal half of a *nodD* gene and a *nod*-box-like sequence confers host-range extension. Mol Microbiol. 1993;9: 1157–68.
45. Okker RJ, Spaik HP, Lugtenberg BJ, Schlaman HR. Mutants in the *nodFEL* promoter of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* reveal a role of individual nucleotides in transcriptional activation and protein binding. Arch Microbiol. 2001;175:152–60.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH ARTICLE

# NrcR, a New Transcriptional Regulator of *Rhizobium tropici* CIAT 899 Involved in the Legume Root-Nodule Symbiosis

Pablo del Cerro<sup>1</sup>, Amanda A. P. Rolla-Santos<sup>2</sup>, Rocío Valderrama-Fernández<sup>3</sup>, Antonio Gil-Serrano<sup>3</sup>, Ramón A. Bellogín<sup>1</sup>, Douglas Fabiano Gomes<sup>2</sup>, Francisco Pérez-Montaño<sup>1</sup>, Manuel Megías<sup>1</sup>, Mariangela Hungria<sup>2</sup>, Francisco Javier Ollero<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Sevilla, Spain, **2** Embrapa Soja, Cx. Postal 231, 86001–970, Londrina, Paraná, Brazil, **3** Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla. Sevilla, Spain

\* [fjom@us.es](mailto:fjom@us.es)



## OPEN ACCESS

**Citation:** del Cerro P, Rolla-Santos AAP, Valderrama-Fernández R, Gil-Serrano A, Bellogín RA, Gomes DF, et al. (2016) NrcR, a New Transcriptional Regulator of *Rhizobium tropici* CIAT 899 Involved in the Legume Root-Nodule Symbiosis. PLoS ONE 11 (4): e0154029. doi:10.1371/journal.pone.0154029

**Editor:** Francisco Martínez-Abarca, Estación Experimental del Zaidín—CSIC, SPAIN

**Received:** February 23, 2016

**Accepted:** April 7, 2016

**Published:** April 20, 2016

**Copyright:** © 2016 del Cerro et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are in the body of the manuscript and in the supporting information.

**Funding:** This work was supported by the Project AGL2012-38831 of the Ministerio de Economía y Competitividad (Spanish Government, [www.mineco.gob.es](http://www.mineco.gob.es)), CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, <http://cnpq.br/>), Science without Borders 400205/2012-5). AAPR-S acknowledges a postdoctoral fellowship from CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, <http://cnpq.br/>), Science without

## Abstract

The establishment of nitrogen-fixing rhizobium-legume symbioses requires a highly complex cascade of events. In this molecular dialogue the bacterial NodD transcriptional regulators in conjunction with plant inducers, mostly flavonoids, are responsible for the biosynthesis and secretion of Nod factors which are key molecules for successful nodulation. Other transcriptional regulators related to the symbiotic process have been identified in rhizobial genomes, including negative regulators such as NolR. *Rhizobium tropici* CIAT 899 is an important symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), and its genome encompasses intriguing features such as five copies of *nodD* genes, as well as other possible transcriptional regulators including the NolR protein. Here we describe and characterize a new regulatory gene located in the non-symbiotic plasmid pRtrCIAT899c, that shows homology (46% identity) with the *nolR* gene located in the chromosome of CIAT 899. The mutation of this gene, named *nrcR* (*nolR*-like plasmid *c* Regulator), enhanced motility and exopolysaccharide production in comparison to the wild-type strain. Interestingly, the number and decoration of Nod Factors produced by this mutant were higher than those detected in the wild-type strain, especially under salinity stress. The *nrcR* mutant showed delayed nodulation and reduced competitiveness with *P. vulgaris*, and reduction in nodule number and shoot dry weight in both *P. vulgaris* and *Leucaena leucocephala*. Moreover, the mutant exhibited reduced capacity to induce the *nodC* gene in comparison to the wild-type CIAT 899. The finding of a new *nod*-gene regulator located in a non-symbiotic plasmid may reveal the existence of even more complex mechanisms of regulation of nodulation genes in *R. tropici* CIAT 899 that may be applicable to other rhizobial species.

Borders 400205/2012-5). MH a research fellow from CNPq (NPq (National Council for Scientific and Technological Development, <http://cnpq.br/>). FPM a postdoctoral fellowship from VPP (University of Seville, <https://investigacion.us.es/secretariado-investigacion/plan-propio>). PdC a FPU fellowship from Ministerio de Economía y Competitividad (FPU14/00160, Spanish Government, [www.mineco.gob.es](http://www.mineco.gob.es)). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

The establishment of the symbiosis between rhizobia and their specific host legumes involves highly complex events that culminate in the formation of nodules and in the establishment of the nitrogen fixation process. Nodulation requires a molecular dialogue between the bacteria and the host plants. The dialogue begins with the exudation of molecules from the legume roots, mostly flavonoids, which are recognized by the specific rhizobium, inducing the transcription of a set of nodulation genes [1, 2]. These genes are responsible for the biosynthesis and secretion of Nod factors (NFs), identified as lipochitooligosaccharides, required for launching the nodulation and the nitrogen-fixation process [3–7].

A large number of bacterial transcriptional regulators actuate nodulation, the most important of which are the NodD proteins, which belong to the LysR-type transcriptional-regulator family. The *nodD* genes are constitutively expressed and their cognate proteins are responsible for the recognition of suitable flavonoids, which start the transcription of the nodulation genes [8, 9]. Another important group of transcriptional regulators is the family of metal-sensing regulatory proteins. In this case, a specific metal-ion union regulates the protein's allosteric conformation and modulates the expression of several target genes. In bacteria, the arsenic repressor family (ArsR) represents one of the most important regulators of the family of metal-sensing proteins. In this family, there are positive and negative transcriptional regulators, which have been described for many bacteria, including several rhizobial species [10–12]. A well-characterized member of this family is the NolR protein, originally described as a general repressor of the activator *nodD1* and the common *nodABC* operon in *Sinorhizobium meliloti* [13–15]. Two models to explain the repression through the NolR protein have been proposed: *i*) in promoters with overlapping transcription initiation and operator sites, NolR binding prevents gene expression enabling RNA polymerase interaction; and *ii*) in promoter regions containing upstream *nod box* (NB) sequences for NodD proteins, NolR binds this promoter region and alters NodD association resulting in inactivation of the gene expression [16]. In *S. fredii* HH103, a *nolR* mutant provoked changes in NF decoration and exopolysaccharide production [17]. However, *S. meliloti* and *S. medicae* *nolR* mutants increased the *nodC* expression, and, in the case of *S. medicae*, improved the competitiveness and nodulation efficiency on *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* [18].

*Rhizobium tropici* strain CIAT 899 (hereafter CIAT 899) is a successful microsymbiont of common bean (*P. vulgaris* L.) in tropical acid soils. The main features of this broad host-range strain include its high tolerance of environmental stresses such as high temperature, acidity and salinity [19–22]. An intriguing feature of CIAT 899 relies on its capacity of producing a large variety of NFs even in the absence of flavonoids when grown under abiotic stresses such as acid or saline conditions [23–30]. Genome sequencing of strain CIAT 899 displayed a large number of genes that code for transcriptional-regulator families, including five *nodD* genes (all of them located in the symbiotic plasmid; pRtrCIAT899b) and one *nolR* gene (located in the chromosome). Moreover, another gene located in the megaplasmid pRtrCIAT899c and encoding an undescribed protein which shares homology with the canonical NolR protein has also been identified [31]. In this study, we performed experiments to shed light on the role of this new, undescribed *nolR*-like transcriptional regulator gene—which we named *nrcR*—during the symbiotic process.

## Materials and Methods

### Bacteria growth conditions, plasmids, mutant obtention

Strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *R. tropici* CIAT 899 strains were grown at 28°C on tryptone yeast (TY) medium [32], B<sup>−</sup> minimal medium [33] or yeast extract



mannitol (YM) medium [34], supplemented when necessary with apigenin 3.7  $\mu\text{M}$  or with NaCl 300 mM. *Escherichia coli* strains were cultured on LB medium [35] at 37°C. When required, the media were supplemented with the appropriate antibiotics as previously described [36]. A similar number of colony forming units (cfu/ml) was obtained for both strains by plating bacteria on addequated solid medium (data not shown).

Primers nolR-like-F (5'-TAG CAG AGC GAT GTC AGA) and nolR-like-R (5'-CGA TGC CAA TTT CCG GAA) were used for amplifying the *nrcR* gene. The 980-bp PCR product was cloned in pGEM®-T Easy (PROMEGA) ( $\text{Amp}^R$  100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and the resulting plasmid was digested with the enzyme *HindIII*, which cuts the *nrcR* gene in one site, and ligated to a 2 kb fragment containing the  $\Omega$  interposon ( $\text{Spc}^R$  100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (S1 Fig). Lastly, this plasmid was digested with *EcoRI* and the 2.98-kb fragment containing the *nrcR::\Omega* was cloned in the rhizobial suicide vector pK18mob [37], that confers resistance to kanamycin ( $\text{km}^R$  30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), equally restricted with *EcoRI*. The generated plasmid pK18mob containing the *nrcR::\Omega* fragment was transferred from *E. coli* strain DH5 $\alpha$  to *R. tropici* CIAT 899 strain by conjugation as described by Simon [38], using plasmid pRK2013 as helper [39], and used for the homogenization of the mutated version of *nrcR* in CIAT 899 by using the methodology previously described [40]. The deletion event was confirmed by PCR and hybridization.

To complement *in trans* the *nrcR* mutation, the pGEM®-T Easy plasmid harboring the 980-bp PCR product that contains the whole *nrcR* gene was digested by *EcoRI* and cloned into the expression vector pBBR1-MCS-5 ( $\text{Gm}^R$  10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) [41], equally digested with the same restriction enzyme, to generate the plasmid pMUS1333. This plasmid was transferred to *nrcR::\Omega* mutant strain by conjugation, obtaining the *nrcR::\Omega* (pMUS1333) strain. The *in cis* complementation of the *nrcR* mutant was carried out cloning the *EcoRI* fragment containing the entire *nrcR* gene into the vector pK18mob, generating plasmid pMUS1353. This plasmid was transferred by conjugation into the *nrcR::\Omega* strain and the kanamycin resistant transconjugant was selected. The *nrcR::\Omega* (pMUS1353) strain harbors the plasmid inserted into the pRtrCIAT899c by simple recombination, thus containing both wild-type and mutated *nrcR* gene.

The parental and derivative strains were deposited at the culture collection of the Department of Biology of the Universidad de Sevilla and at the Diazotrophic and Plant Growth Promoting Bacteria Culture Collection of Embrapa Soja (WFCC Collection # 1213, WDCM Collection # 1054).

## Bioinformatics

The Phyre2 web portal (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) was used to analyze and predict the function of the NrcR protein [42]. To confirm the prediction obtained, comparisons and similarity analysis among NrcR and the set of protein were carry out using the Basic Local Alignment Search tool (BLAST) suite of NCBI [43].

Specific protein alignments were performed using the ClustalW online platform, [44]. The multiple sequence alignments were edited by using Boxshade at EMBnet.

**Table 1. Bacterial strains and plasmids employed in this study.**

Strain or plasmid	Derivation and relevant properties	Source or reference
<i>R. tropici</i> CIAT 899	Wild-type strain, $\text{Rif}^R$	[19]
<i>nrcR::\Omega</i>	<i>R. tropici</i> CIAT 899 <i>nrcR::\Omega</i> , $\text{Rif}^R$ $\text{Spc}^R$	This work
<i>nrcR::\Omega</i> (pMUS1333)	<i>nrcR</i> mutant complemented <i>in trans</i> , $\text{Rif}^R$ $\text{Spc}^R$ $\text{Gm}^R$	This work
<i>nrcR::\Omega</i> (pMUS1353)	<i>nrcR</i> mutant complemented <i>in cis</i> , $\text{Rif}^R$ $\text{Spc}^R$ $\text{Km}^R$	This work
pMUS1333	pBBR1-MCS-5 containing the entire <i>nrcR</i> gene, $\text{Gm}^R$	This work
pMUS1353	pK18mob containing the entire <i>nrcR</i> gene, $\text{Km}^R$	This work

doi:10.1371/journal.pone.0154029.t001

## Motility assays

Swimming and surface motility phenotypes were assayed on TY and B<sup>-</sup> minimal medium, supplemented when necessary with NaCl 300 mM or apigenin 3.7  $\mu$ M. The CIAT 899 and derivative strains were grown in 5 ml of TY medium on an orbital shaker (180 rpm) for 96 h at 28°C. Aliquots of 2  $\mu$ L of culture suspensions were sink-inoculated in swimming assays (0.28% agar) or drop-inoculated in surface motility assays (0.4% agar) onto Petri dishes and air-dried. Bacterial growth was determined measuring the optical density (O.D.) at 600 nm. All plates were wrapped with parafilm and incubated at 28°C in an upright position and the halo diameters were measure each 24 h. Each experiment was performed three times with three replicates each time.

## Biofilm formation assay

The biofilm formation assay on polystyrene surfaces was performed as previously described [45]. CIAT 899 and derivative strains were grown on TY medium, supplemented with NaCl 300 mM or apigenin 3.7  $\mu$ M when required, for 7 days with gentle rocking at 28°C. Each experiment was performed three times with eight replicates per time.

## Quantitative and qualitative analyses of external polysaccharides

The anthrone-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method, which measures the total reducing sugar content in a given sample [46], was used to determine the total carbohydrate amounts of EPS contained in supernatants of the bacterial cultures. For this purpose, CIAT 899 and derivative strains were grown in 5 mL of liquid YM medium on an orbital shaker (180 rpm) for 96 h at 28°C. When required, the media were supplemented with NaCl (300 mM) or apigenin (3.7  $\mu$ M). Samples of 1 mL were centrifuged to remove cells. Cell-free culture supernatants were assayed for EPS content via sulfuric acid hydrolysis in the presence of the colorimetric indicator anthrone. Every experiment was performed three times with three replicates each time.

For the isolation of EPS, CIAT 899 and derivatives strains were cultured for five days at 28°C (late stationary phase) in 45 mL of YM medium and concentrated to about 20% of the initial volume on a rotary evaporator; following, three volumes of cold ethanol were added and the solution was maintained at 4°C for 24 h. Following, the solution was centrifuged and the resulting precipitate was dissolved in water and purified by dialysis against distilled water at 4°C, and then freeze-dried. Monosaccharides were identified on Gas-Liquid Chromatography (GLC Agilent 7809A) coupled with mass spectrometry (MS Agilent 5975 mass detector) separation of their per-O-trimethylsilylated methyl glycosides as previously described [29]. Finally, Nuclear Magnetic Resonance (NMR) was carried out. Samples were deuterium-exchanged twice by freeze-drying from D<sub>2</sub>O and then examined in solution (around 5 mg 750  $\mu$ L<sup>-1</sup>) in 99.9% D<sub>2</sub>O. <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded at 353 K on a Bruker AV500 spectrometer operating at 500.20 MHz (1H). The HDO signal (4.22 ppm at 353 K) was used as reference.

Lipopolysaccharide (LPS) extraction, separation on SDS-PAGE, and silver staining were performed as previously described using the same bacteria, medium and conditions [29].

## Identification of NFs

Purification and LC-MS/MS analyses of NFs produced by the wild-type and *nrcR* mutant strains growth in B<sup>-</sup> minimal medium, supplemented when required with NaCl 300 mM or apigenin 3.7  $\mu$ M, were performed as described previously [27].

## RNA isolation, cDNA synthesis and qRT-PCR

The wild-type and *nrcR* mutant strains were pre-cultured in 10 mL aliquots of TY medium at 100 rpm and 28°C in the dark. After 48 h, the strains pre-inoculated were transferred to fresh media supplemented when necessary with 300 mM of NaCl or 3.7 µM of apigenin. These cultures were grown under the same conditions than pre-cultures until to reach an OD 600 nm of 0.5 to 0.6.

Total RNA was extracted using Trizol® reagent (Invitrogen/Life Technologies) as previously described [47]. The total RNA concentration was estimated in a NanoDrop ND 1000 spectrophotometer (NanoDrop-Technologies, Inc.) and the integrity was assessed by gel electrophoresis. Extracted RNA samples were treated with DNase I (Invitrogen/Life Technologies) and the first stand of cDNA was synthesized using SuperscriptIII™ reverse transcriptase (Invitrogen/Life Technologies), according to manufacturer's protocol.

Primers for the qRT-PCR assays (genes *nodC*, *exoA*, and *exoX*), based on *R. tropici* CIAT 899 genome, were designed using Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>), to obtain amplicons of 50–150 bp. A pair of primers for 16S rRNA was also obtained and applied to normalize the relative expression of the targets. To avoid unspecific alignments, the primers sequences were searched against the *R. tropici* CIAT 899 genome (Accession numbers NC\_020059, NC\_020060, NC\_020061, NC\_020062, for chromosome, pRtrCIAT899a, pRtrCIAT899b and pRtrCIAT899c, respectively).

qRT-PCR reactions were performed as described before [29]. The fold changes of three biological samples with three technical replicates of each condition were obtained.

## Nodulation assays

For the evaluation of the symbiotic phenotypes, wild-type and *nrcR* mutant strains of *R. tropici* CIAT 899 were grown in YM medium till the concentration of  $10^9$  cells mL<sup>-1</sup>. Surface-sterilized seeds of common bean (*P. vulgaris*) and leucaena (*L. leucocephala*.) were pre-germinated for 2 days at 28°C and placed on sterilized pouch bags or Leonard jars containing Fähræus N-free solution [34]. Germinated seeds were then inoculated with 1 mL of bacterial culture or with 1 mL of a mix (1/1, v/v) of two bacterial cultures for competitiveness assays. Growth conditions were 16 h at 26°C in the light and 8 h and 18°C in the dark, with 70% of humidity.

Nodulation parameters were evaluated after 15 days for early nodulation test, and after 30 or 50 days in late nodulation assays for common bean or leucaena, respectively. In all cases, shoots were dried at 70°C for 48 h and weighed.

To evaluate nodule occupancy in the competitiveness assays, 200 nodules from eight plants (25 nodules per plant), were analyzed. Nodules were surface-sterilized [34] and placed on TY plates to confirm lack of surface contamination. These nodules were smashed, streaked in TY with actidione (100 µg/mL), and grown at 28°C for 2–3 days. Isolated colonies were independently picked on TY and TY supplemented with spectinomycin to discriminate the wild-type and *nrcR::Ω* mutant strain (Spc<sup>R</sup>).

Isolation of the *nrcR::Ω*, *nrcR::Ω* (pMUS1333) or *nrcR::Ω* (pMUS1353) strains from nodules was performed growing nodule extracts on TY plates supplemented with suitable antibiotics.

Nodulation experiments were performed three times.

## Results

### Gene characterization

The sequence of the *R. tropici* CIAT 899 genome revealed the presence of an undescribed transcriptional regulator member of the ArsR family (locus tag RTCIAT899\_PC05430) located in the megaplasmid pRtrCIAT899c (2.08 Mb) [31]. Protein blast of this transcriptional regulator

showed 46% identity and 65% of positive residues with the peptide sequence of the chromosomal *R. tropici* CIAT 899 NolR protein (locus tag RTCIAT899\_CH13035). Interestingly, the highest homology between the NrcR and NolR proteins was found within the DNA-binding domain (64% of identity and 72% of positive residues), indicating that the proteins share some regulatory DNA targets (S2 Fig). Besides, NrcR also showed high identities with several undescribed ArsR-type proteins (69%–93%) of different soil bacteria and with various rhizobia NolR proteins (41%–48%) (S1 Table). Lastly, the Phyre2 web portal for protein modeling and functioning revealed that this new protein featured the highest values of confidence (99.9) and identity with the crystal structure of *S. fredii* NolR protein.

Taking into consideration these data, we decided to name this gene *nrcR*, meaning “nolR-like plasmid c Regulator.” The *nrcR* gene was mutated by insertion of the  $\Omega$  interposon and complemented *in cis* and *in trans* with the whole *nrcR* gene copy (See Materials and Methods).

## Studies of the swimming and surface motilities, biofilm formation, EPS production and LPS profiles in the *nrcR* mutant

Phenotypes related to the symbiotic process, such as swimming and on surface motility, biofilm formation, EPS production and LPS profiles, were evaluated in the wild-type and in the *nrcR* mutant strains in the presence or in the absence of apigenin and salt.

No changes were observed in swimming motility, biofilm formation or LPS profile between the wild-type and the *nrcR* mutant strains (data not shown).

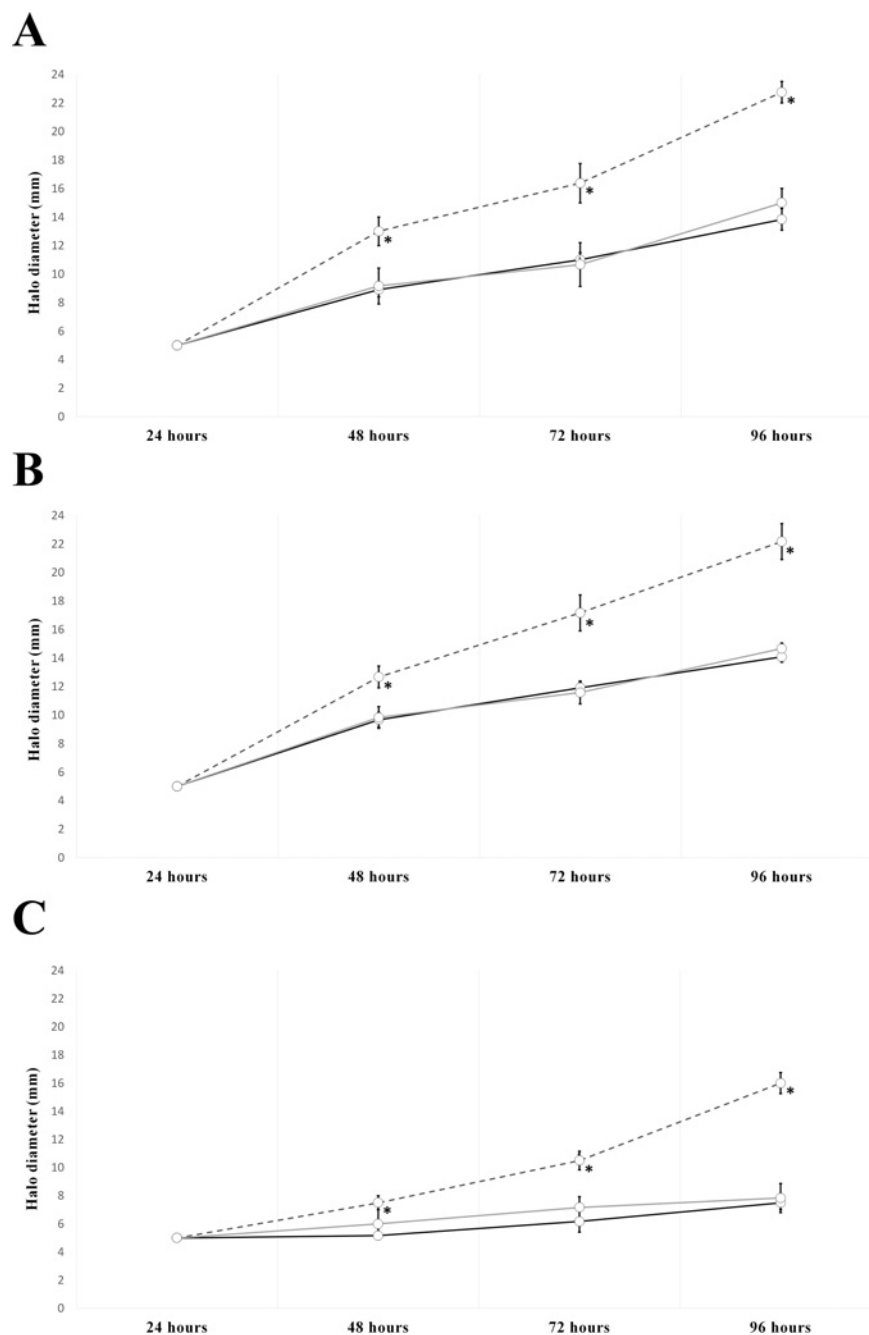
Surface motility was assayed on TY (rich) and B<sup>-</sup> (minimal) media. Only in the case of the rich-medium assays (TY), were significant differences in surface motility found (Fig 1). The *nrcR::Ω* mutant was about 40% more mobile than the parental strain in TY medium and TY supplemented with apigenin (Fig 1A and 1B). Moreover, in the case of the mutant strain, increased mucosity was observed when bacteria were drop-inoculated on the surface of TY + 0.4% agar medium supplemented or not with apigenin (S3 Fig). The presence of salt resulted in drastic reduction of this motility in all assayed strains. Nevertheless, while the wild-type strain was practically immobile under saline condition, the *nrcR* mutant was mobile (Fig 1C). As expected, these increments in motility were lost in the complemented strain *nrcR::Ω* (pMUS1333) in all conditions assayed.

EPS production was evaluated by the anthrone method. The *nrcR::Ω* strain produced a significantly higher quantity of EPS than with CIAT 899 strain in all conditions assayed (Fig 2). This phenotype was reversed in the complemented *nrcR::Ω* (pMUS1333) strain. Moreover, in the presence of apigenin, the EPS production seemed to slightly decrease in both wild-type and *nrcR* mutant strains (in comparison to the EPS production in YM or YM supplemented with salt). In contrast, qRT-PCR experiments were performed to measure the expression of the *exoA* gene, involved in biosynthesis of EPS, and the *exoX* gene, an inhibitor of EPS production, in the mutant and in the wild-type strains. No significant differences in the relative expressions of *exoA* and *exoX* were detected in all assay conditions (data not shown). Finally, we evaluated the EPS composition by monosaccharide analysis and nuclear magnetic resonance (NMR). The sugar composition and 1H-NMR spectra obtained were almost identical in both CIAT 899 and *nrcR::Ω* strains (data not shown). Therefore, results suggest that the NrcR transcriptional regulator inhibits, directly or indirectly, the production of EPS, but with no effect on its qualitative composition.

## NF-production patterns and *nod*-gene expression of the *nrcR* mutant

In order to determine if the *nrcR* mutation affects the production and decoration of these molecules, the NF profiles of bacteria grown in B<sup>-</sup> supplemented or not with apigenin or salt were

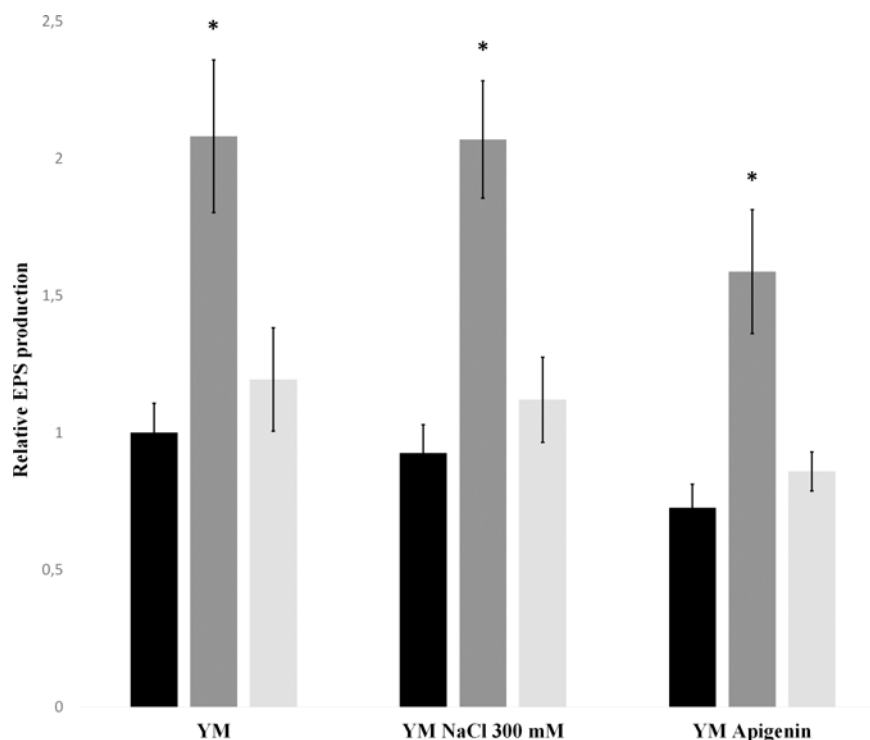




**Fig 1. Surface motility phenotype of *R. tropici* CIAT 899 and the *nrcR::Ω* mutant strain.** Quantified motile ring diameters of wild-type strain (black continuous line), *nrcR::Ω* mutant strain (dark gray discontinuous line) and the *nrcR::Ω* (pMUS1333) complemented strain (light gray continuous line). Values represent the averages of three different experiments per strain. The *nrcR::Ω* and *nrcR::Ω* (pMUS1333) strains parameters were individually compared with their correspondent CIAT 899 strain in each condition by using the Mann-Whitney non-parametric test. Values tagged by asterisks (\*) are significantly different (α = 5%). (A) TY medium. (B) TY medium supplemented with 3.7 μM of apigenin. (C) TY medium supplemented with 300 mM of NaCl.

doi:10.1371/journal.pone.0154029.g001

determined (Tables 2–4) (see [Materials and Methods](#)). Under control conditions, both wild-type and *nrcR* mutant strains synthesized 11 and 15 different NFs, respectively. From these



**Fig 2. EPS production of *R. tropici* CIAT 899 (black bars), the *nrcR::Ω* (dark gray bars) and the *nrcR::Ω* (pMUS1333) (light gray bars) strains.** Values were relative to CIAT 899 under control condition. Each experiment was performed three times. Both *nrcR::Ω* and *nrcR::Ω* (pMUS1333) strain parameters were individually compared with the parental strain without induction by using the Mann-Whitney non-parametric test. Values tagged by asterisks (\*) are significantly different at the level of  $\alpha = 5\%$ .

doi:10.1371/journal.pone.0154029.g002

NFs, eight were produced by both strains, three were exclusively produced by the parental strain and seven only by the mutant strain (Table 2). Furthermore, in the *nrcR::Ω* strain, four NFs presenting five subunits of GlcNAc (V) were sulphated (S), and two of them were also N-methylated (NMe) [V (C<sub>18:1</sub>, S), V (C<sub>18:0</sub>, S), V (C<sub>18:1</sub>, NMe, S) and V (C<sub>18:0</sub>, NMe, S)]. In contrast, the CIAT 899 strain synthesized only one NF sulphated and N-methylated [V (C<sub>18:1</sub>, NMe, S)].

On the other hand, in the presence of apigenin, both strains synthesized 29 NFs (Table 3), 23 of which were common to both strains, and 6 were exclusive to each strain. Interestingly, only the wild-type strain synthesized NF deacetylated at the glucosamine residue [V (C<sub>18:1</sub>, dNAc) and V (C<sub>18:1</sub>, NMe, dNAc)], while the *nrcR::Ω* strain produced NFs with five residues of N-acetyl glucosamine and fatty acid of 20 atoms of carbon [V (C<sub>20:1</sub>), V (C<sub>20:1</sub>, NMe) and V (C<sub>20:1</sub>, NMe, S)], which were not synthesized by the parental strain.

Finally, in the presence of salt, the *nrcR* mutant strain synthesized 47 NFs versus 36 produced by the parental strain (Table 4). The CIAT 899 strain produced only 3 NFs with a fatty acid comprising 20 atoms of carbon [V (C<sub>20:0</sub>, NMe), V (C<sub>20:1</sub>, NMe), and V (C<sub>20:0</sub>, NMe, S)], while the *nrcR::Ω* strain synthesized 7 NFs with fatty acids of 20 atoms of carbon, including a backbone with 3, 4, and 5 residues of N-acetylglucosamine (Table 4).

In summary, the NFs produced by the *nrcR* mutant strain presented more sulphated substitutions in the reducing N-acetylglucosamine residue than those produced by the wild-type strain. In fact, the parental strain produced, in salt conditions, only a sulphated NF, V (C<sub>18:1</sub>, S), which was not produced by the mutant *nrcR::Ω* strain (Table 4). Moreover, in relation to the fatty acids of 20 atoms of carbon, the wild-type strain synthesized only 4 of these NFs, one in the presence of apigenin and 3 in salt conditions, while the mutant strain synthesized 15 NFs

**Table 2. Nod Factor structures biosynthesized under control conditions (B<sup>-</sup> medium) by the wild-type strain CIAT 899 and the *nrcR*::Ω mutant.**

[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	B <sub>i</sub> ions	Structure <sup>a</sup>	CIAT 899 <sup>b</sup>	<i>nrcR</i> ::Ω <sup>b</sup>
824	400, 603	III (C <sub>16:0</sub> )	-	+
838	414, 617	III (C <sub>16:0</sub> , NMe)	-	+
850	426, 629, 832	III (C <sub>18:1</sub> )	+	+
864	440, 643	III (C <sub>18:1</sub> , NMe)	-	+
1027	400, 603, 806	IV (C <sub>16:0</sub> )	+	+
1041	414, 617, 820	IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)	-	+
1053	426, 629, 832	IV (C <sub>18:1</sub> )	+	+
1055	428, 631, 834	IV (C <sub>18:0</sub> )	+	-
1067	440, 643, 846	IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+
1216	386, 589, 792, 995	V (C <sub>14:0</sub> , NMe)	+	-
1230	400, 603, 806, 1009	V (C <sub>16:0</sub> )	+	-
1244	414, 617, 820, 1023	V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+
1256	426, 629, 832, 1035	V (C <sub>18:1</sub> )	+	+
1270	440, 643, 846, 1049	V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+
1336	426, 629, 832, 1035	V (C <sub>18:1</sub> , S)	-	+
1338	428, 631, 834, 1037	V (C <sub>18:0</sub> , S)	-	+
1350	440, 643, 846, 1049, [M-80] <sup>+</sup> <sup>c</sup> = 1270	V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	+	+
1352	442, 645, 848, 1051, [M-80] <sup>+</sup> <sup>c</sup> = 1272	V(C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	-	+

<sup>a</sup> NF structures are represented following the convention [64] that indicates the number of GlcNAc residues in the backbone (Roman numeral), the length and degree of unsaturation of the fatty acyl chain, and the other substituents, which are listed in the order in which they appear, moving clockwise from the fatty acid. NMe, *N*-methyl group at glucosamine non reducing residue; S, sulfate group at reducing glucosamine residue.

<sup>b</sup> Symbol: + = detected;— = non detected.

<sup>c</sup> These ions arise by loss of a neutral with mass 80 Da, corresponding to the loss of SO<sub>3</sub>.

doi:10.1371/journal.pone.0154029.t002

harbouring C<sub>20</sub> fatty acid, 4 in the presence of apigenin and 12 in the presence of salt (Tables 3 and 4). Therefore, the study of NF-production patterns indicated that mutation in the *nrcR* gene results in differences in number and decoration of the NFs, especially under salinity stress.

To verify the potential role of the *nrcR* gene in NFs synthesis, the relative expression of *nodC* gene was evaluated. This gene is highly transcribed in the presence both of apigenin and of salt in *R. tropici* CIAT 899. In fact, this gene is part of the main set of genes responsible for the synthesis of NFs, the *nodABCSUIJHPQ* operon. qRT-PCR experiments showed that the *nodC* relative expression was significantly lower in the presence both of apigenin and of salt in the *nrcR*::Ω mutant strain in comparison with the expression of this gene in the wild-type strain (Fig 3). In the mutant strain, the expression of the *nodC* gene decreased about 35-fold to 9-fold in the presence of salt and about 40-fold to 9.5-fold in the presence of apigenin.

## Symbiotic performance

The nodulation phenotype in common bean was firstly evaluated in plants grown in pouch bags for 15 days. Although plants inoculated with CIAT 899 developed nodules 15 days after inoculation, none were observed on plants inoculated with the *nrcR* mutant strain (Fig 4). Furthermore, symbiotic performance was also evaluated in Leonard jars using common bean and leucaena as host plants. At 30 days after inoculation in common bean, the *nrcR* mutant significantly decreased nodule number (by 36%) in comparison to the parental strain. Furthermore,

**Table 3. Nod Factor structures biosynthesized in the presence of apigenin (3.7  $\mu$ M) by the wild-type strain CIAT 899 and the *nrcR*:: $\Omega$  mutant.**

[M+H] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	B <sub>i</sub> ions	Structure <sup>a</sup>	CIAT 899 <sup>b</sup>	<i>nrcR</i> :: $\Omega$ <sup>b</sup>
824	400, 603	III (C <sub>16:0</sub> )	-	+
838	414, 617	III (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+
850	426, 629	III (C <sub>18:1</sub> )	+	+
852	428, 631	III (C <sub>18:0</sub> )	+	+
864	440, 643	III (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+
999	372, 575, 778	IV (C <sub>14:0</sub> )	+	+
1011	384, 597, 790	IV (C <sub>14:1</sub> , NMe)	+	-
1013	386, 589, 792	IV (C <sub>14:0</sub> , NMe)	+	+
1025	398, 601, 804	IV (C <sub>16:1</sub> )	+	-
1027	400, 603, 806	IV (C <sub>16:0</sub> )	+	+
1039	412, 615, 818	IV (C <sub>16:1</sub> , NMe)	+	+
1041	414, 617, 820	IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+
1053	426, 629, 832	IV (C <sub>18:1</sub> )	+	+
1055	428, 631, 834	IV (C <sub>18:0</sub> )	+	+
1067	440, 643, 846	IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+
1069	442, 645, 848	IV (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	+
1081	454, 657, 860	IV (C <sub>20:1</sub> )	+	+
1202	372, 575, 778, 981	V (C <sub>14:0</sub> )	+	-
1214	426, 629, 790, 832, 993 <sup>d</sup>	V (C <sub>18:1</sub> , dNAc)	+	-
1216	386, 589, 792, 995	V (C <sub>14:0</sub> , NMe)	+	+
1228	440, 643, 846, 1007 <sup>e</sup>	V (C <sub>18:1</sub> , NMe, dNAc)	+	-
1230	400, 603, 806, 1009	V (C <sub>16:0</sub> )	+	+
1242	412, 615, 818, 1021	V (C <sub>16:1</sub> , NMe)	+	+
1244	414, 617, 820, 1023	V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+
1256	426, 629, 832, 1035	V (C <sub>18:1</sub> )	+	-
1258	428, 631, 834, 1037	V (C <sub>18:0</sub> )	-	+
1270	440, 643, 846, 1049	V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+
1272	442, 645, 848, 1051	V (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	+
1284	454, 657, 860, 1063	V (C <sub>20:1</sub> )	-	+
1298	468, 671, 874, 1077	V (C <sub>20:1</sub> , NMe)	-	+
1324	414, 617, 820, 1023	V (C <sub>16:0</sub> , NMe, S)	+	+
1336	426, 629, 832, 1035	V (C <sub>18:1</sub> , S)	+	+
1350	440, 643, 846, 1049, [M-80] <sup>++c</sup> = 1270	V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	+	+
1352	442, 645, 848, 1051	V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	-	+
1378	468, 671, 874, 1077	V (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)	-	+

<sup>a</sup> NF structures are represented following the convention [64] that indicates the number of GlcNAc residues in the backbone (Roman numeral), the length and degree of unsaturation of the fatty acyl chain, and the other substituents, which are listed in the order in which they appear, moving clockwise from the fatty acid. NMe, *N*-methyl group at glucosamine non reducing residue; S, sulfate group at reducing glucosamine residue.

<sup>b</sup> Symbol: + = detected;— = non detected.

<sup>c</sup> These ions arise by loss of a neutral with mass 80 Da, corresponding to the loss of SO<sub>3</sub>.

<sup>d</sup> Mixture of two Nod Factors, deacetylated at glucosamine residues numbers 2 and 3, respectively.

<sup>e</sup> Nod Factor deacetylated at glucosamine residue number 2.

doi:10.1371/journal.pone.0154029.t003

**Table 4. Nod Factor structures biosynthesized in the presence of NaCl 300 mM by the wild-type strain CIAT 899 and the *nrcR*:: $\Omega$  mutant.**

[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	B <sub>i</sub> ions	Structure <sup>a</sup>	CIAT 899 <sup>b</sup>	<i>nrcR</i> :: $\Omega$ <sup>b</sup>
811	428, 631	II Hex (C <sub>18:0</sub> )	-	+
824	400, 603	III (C <sub>16:0</sub> )	+	+
838	414, 617	III (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+
850	426, 629	III (C <sub>18:1</sub> )	+	+
852	428, 631, 834	III (C <sub>18:0</sub> )	-	+
864	440, 643	III (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+
866	442, 645, 848	III (C <sub>18:0</sub> , NMe)	-	+
878	454, 657	III (C <sub>20:1</sub> )	-	+
892	468, 671	III (C <sub>20:1</sub> , NMe)	-	+
999	372, 575, 778	IV (C <sub>14:0</sub> )	+	+
1013	386, 589, 792	IV (C <sub>14:0</sub> , NMe)	+	+
1025	398, 601, 804	IV (C <sub>16:1</sub> )	+	-
1026	440, 643, 846	III Hex (C <sub>18:1</sub> , NMe)	-	+
1027	400, 603, 806	IV (C <sub>16:0</sub> )	+	+
1028	442, 645, 848	III Hex (C <sub>18:0</sub> , NMe)	-	+
1039	412, 615, 818	IV (C <sub>16:1</sub> , NMe)	-	+
1041	414, 617, 820	IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+
1053	426, 629, 832	IV (C <sub>18:1</sub> )	+	+
1055	428, 631, 834	IV (C <sub>18:0</sub> )	+	+
1067	440, 643, 846	IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+
1069	442, 645, 848	IV (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	+
1083	456, 659, 862	IV (C <sub>20:0</sub> )	-	+
1095	468, 671, 874	IV (C <sub>20:1</sub> , NMe)	-	+
1097	470, 673, 876	IV (C <sub>20:0</sub> , NMe)	-	+
1147	440, 643, 846	IV (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	+	+
1149	442, 645, 848	IV (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	+	+
1177	470, 673, 876	IV (C <sub>20:0</sub> , NMe, S)	-	+
1203	414, 617, 820, 1023	IV Hex (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+
1205	414, 617, 820, 1023	IV Hex-ol (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	-
1215	426, 629, 832, 1035	IV Hex (C <sub>18:1</sub> )	+	-
1216	386, 589, 792, 995	V (C <sub>14:0</sub> , NMe)	+	+
1229	440, 643, 846, 1049	IV Hex (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+
1230	400, 603, 806, 1009	V (C <sub>16:0</sub> )	+	-
1231	440, 643, 846, 1049	IV Hex-ol (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	-
1231	442, 645, 848, 1051	IV Hex (C <sub>18:0</sub> , NMe)	-	+
1233	442, 645, 848, 1051	IV Hex-ol (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	-
1242	412, 615, 818, 1021	V (C <sub>16:1</sub> , NMe)	+	+
1244	414, 617, 820, 1023	V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+
1256	426, 629, 832, 1035	V (C <sub>18:1</sub> )	+	+
1257	468, 671, 874, 1077	IV Hex (C <sub>20:1</sub> , NMe)	-	+
1258	428, 631, 834, 1037	V (C <sub>18:0</sub> )	+	+
1259	470, 673, 876, 1079	IV Hex (C <sub>20:0</sub> , NMe)	-	+
1270	440, 643, 846, 1049	V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+
1272	442, 645, 848, 1051	V (C <sub>18:0</sub> , NMe)	+	+
1284	454, 657, 860, 1063	V (C <sub>20:1</sub> )	-	+
1298	468, 671, 874, 1077	V (C <sub>20:1</sub> , NMe)	+	+

(Continued)

Table 4. (Continued)

[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	B <sub>i</sub> ions	Structure <sup>a</sup>	CIAT 899 <sup>b</sup>	<i>nrcR</i> ::Ω <sup>b</sup>
1300	470, 673, 876, 1079	V (C <sub>20:0</sub> , NMe)	-	+
1324	414, 617, 820, 1023	V (C <sub>16:0</sub> , NMe, S)	+	+
1336	426, 629, 832, 1035	V (C <sub>18:1</sub> , S)	+	-
1350	440, 643, 846, 1049, [M-80] <sup>+</sup> = 1270	V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	+	+
1352	442, 645, 848, 1051	V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	+	+
1366	456, 659, 862, 1065	V (C <sub>20:0</sub> , S)	-	+
1378	468, 671, 874, 1077	V (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)	+	+
1380	470, 673, 876, 1079	V (C <sub>20:0</sub> , NMe, S)	+	+

<sup>a</sup> NF structures are represented following the convention [64] that indicates the number of GlcNAc residues in the backbone (Roman numeral), the length and degree of unsaturation of the fatty acyl chain, and the other substituents, which are listed in the order in which they appear, moving clockwise from the fatty acid. Hex, hexose; Hex-ol, hexitol (reduced terminal hexose); NMe, *N*-methyl group at glucosamine non reducing residue; S, sulfate group at reducing glucosamine residue.

<sup>b</sup> Symbol: + = detected;— = non detected.

<sup>c</sup> These ions arise by loss of a neutral with mass 80 Da, corresponding to the loss of SO<sub>3</sub>.

doi:10.1371/journal.pone.0154029.t004

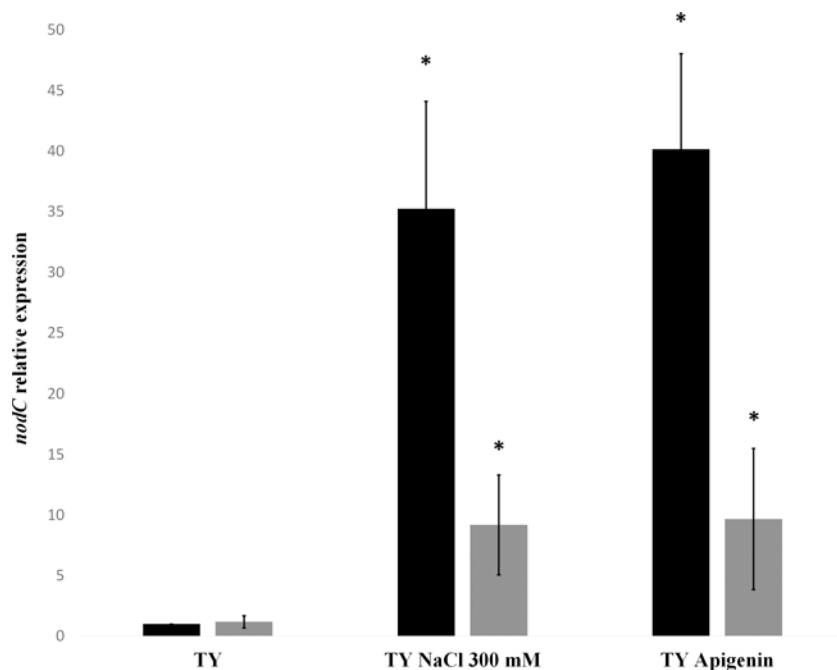
the decrease in nodulation was reflected in lower shoot dry weight (25% less) of plants inoculated with the mutant strain (Table 5).

When leucaena was inoculated with the *nrcR* mutant, significant differences in nodulation were also observed at 50 days, *i.e.* decreases of 41% in nodule number and of 20% in shoot dry weight in comparison to the wild-type strain. The *in trans* complementation [*nrcR*::Ω (pMUS1333)] of the *nrcR* mutant did not restore the nodulation phenotypes (Table 5). In fact, the rhizobia isolated from nodules induced by this strain in bean and leucaena plants were Spc<sup>r</sup> Gm<sup>s</sup>, indicating loss of the pMUS1333 plasmid. For this reason, an *in cis* *nrcR*-complemented strain [*nrcR*::Ω (pMUS1353)] was constructed. In this case, the complementation restored symbiotic characteristics in both plants (Table 5).

Moreover, the competitiveness assays showed that the mutant strain was less competitive for nodulation on common bean plants than the wild-type strain (Fig 5). Indeed, after 45 days of inoculation, the *nrcR* mutant occupied only 10% of the nodules.

## Discussion

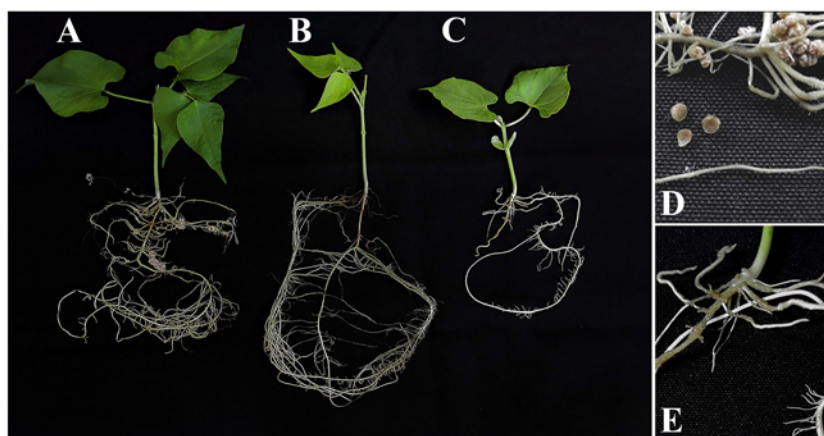
The participation of NodD transcriptional regulators in conjunction with plant inducers, mostly flavonoids, is required for *nod*-gene expression in rhizobia, which represents the beginning of the nodulation process. The absence of the transcriptional regulator repressor NolR provokes changes in NF decoration as well as decreases in nodulation efficiency in other rhizobial species and strains such as *S. fredii* and *S. meliloti*, indicating that a fine-tuning of *nod*-gene expression is required for optimal nodulation of the plant host [13, 17]. A structural and biochemical analysis of the NolR protein revealed that a DNA-protein interaction domain is essential to the full understanding of its transcriptional repression role in several target genes [18]. In this study, we investigated a new potential symbiotic regulator belonging to the ArsR family of proteins located in the non-symbiotic plasmid pRtrCIAT899c of *R. tropici* CIAT 899. Here, we report that this transcriptional regulator, named NrcR, shares homology in the sequence, especially in the DNA-binding domain, with NolR. We have demonstrated that the mutation of the *nrcR* gene affects several steps of the symbiosis of CIAT 899 with host legumes, revealing a novel level of regulation.



**Fig 3. qRT-PCR analysis of the expression of *nodC* gene from *R. tropici* CIAT 899 and the *nrcR::Ω* strain grown in the absence or presence of apigenin (3.7  $\mu$ M) or NaCl (300 mM).** Expression data were individually compared with the expression without inducing molecules of the wild-type strain by using the Mann-Whitney non-parametrical test. The asterisks (\*) indicate a significant different at the level  $\alpha = 5\%$ . Black bars represent wild-type strain and dark gray bars represent the *nrcR::Ω* mutant strain.

doi:10.1371/journal.pone.0154029.g003

We found that the NrcR transcriptional regulator inhibits surface motility, as the mutant strain consistently showed higher mobility than the parental strain (Fig 1). Nowadays, five types of motility are ascribed to bacteria [48] and it remains to be discovered which one is altered by the absence of NrcR. For this reason, we have generically defined this phenotype as a surface motility type.



**Fig 4. Early nodulation phenotype in common bean inoculated with CIAT 899 and *nrcR::Ω* strains assayed in pouch bags.** 1 mL of a culture containing  $10^9$  cells  $\text{mL}^{-1}$  was used as inoculum. Experiment performed under controlled conditions of growth chamber and plants harvested at 15 days after inoculation. (A) wild-type strain. (B) Uninoculated control. (C) *nrcR::Ω* strain. (D) Roots inoculated with the CIAT 899 strain. (E) Roots inoculated with the *nrcR::Ω* strain.

doi:10.1371/journal.pone.0154029.g004



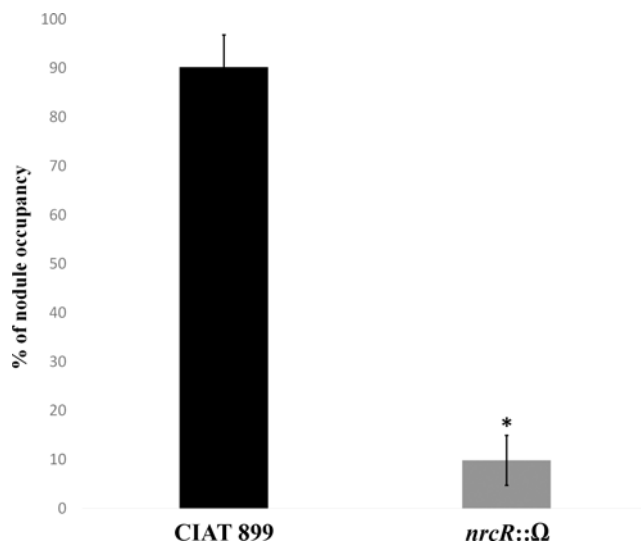
**Table 5. Plant responses to inoculation of common bean and leucaena with *R. tropici* CIAT 899 and derivative strains.**

Strains	<i>P. vulgaris</i> <sup>a</sup>		<i>L. leucocephala</i> <sup>a</sup>	
	Nodule number	Shoot dry weight (g)	Nodule number	Shoot dry weight (g)
<i>R. tropici</i> CIAT 899	251.3 ± 30.25	1.58 ± 0.21	17.5 ± 3.1	0.49 ± 0.05
<i>nrcR</i> ::Ω	160.2 ± 28.38*	1.18 ± 0.37	10.3 ± 3.73*	0.39 ± 0.03*
<i>nrcR</i> ::Ω (pMUS1333)	158.5 ± 36.13*	1.10 ± 0.21*	10.1 ± 3.89*	0.36 ± 0.05*
<i>nrcR</i> ::Ω (pMUS1353)	220.6 ± 44.37	1.41 ± 0.33	16.7 ± 3.5	0.48 ± 0.03
none	0 ± 0*	0.70 ± 0.18*	0 ± 0*	0.23 ± 0.05*

<sup>a</sup> Data represent means ± S.D. of six plant jars. Each jar contained two plants. Common bean plants were evaluated 30 days after inoculation. Leucaena plants were evaluated 50 days after inoculation. The *nrcR*::Ω, *nrcR*::Ω (pMUS1333) and *nrcR*::Ω (pMUS1353) parameters were individually compared with the parental strain CIAT 899 by using the Mann-Whitney non-parametric test. Values tagged by asterisk (\*) are significantly different ( $\alpha = 5\%$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0154029.t005

The EPS produced by rhizobia has different structural functions, such as a protective barrier against environmental stresses [49, 50]. In CIAT 899, the EPS is an octasaccharide formed by D-glucose, D-galactose, pyruvic and acetic acids, with a ratio of 3:1 between glucose and galactose [51]. Interestingly, the *nrcR*::Ω strain produced a significantly higher amount of EPS than the parental CIAT 899 (Fig 2), but with no difference in the proportion of sugar detected in the NMR analysis. In addition to the protective role of the CIAT 899 EPS, it is worth mentioning that an increase in the EPS production by *S. fredii* HH103 promotes surface motility [52]. Thus, it is possible that the over-production of EPS by the *nrcR* mutant could contribute to its increased motility. Remarkably, *nrcR* gene is located in the CIAT 899 megaplasmid that also carries the *exo* genes, which are implied in the biosynthesis of EPS [53]. Thus, the relative position of all these genes is another clue that could be relating EPS production with the NrcR protein. However, the higher production of EPS by the *nrcR* mutant was not related to an increased expression of the *exoA* gene (involved in the biosynthesis of EPS), nor to a repression



**Fig 5. Competitiveness assay of CIAT 899 and *nrcR*::Ω strains in common bean.** 0.5 mL of each bacterial culture containing  $10^9$  cells  $\text{mL}^{-1}$  was used as inoculum. Percentages of nodule occupancy were evaluated for both strains in common bean plants after 45 days of inoculation. Values are the averages of three experiments. The *nrcR*::Ω strain values were individually compared with their correspondent wild-type strain CIAT 899 by using the Mann-Whitney non-parametric test. Value tagged by asterisk (\*) is significantly different at the level  $\alpha = 5\%$ .

doi:10.1371/journal.pone.0154029.g005



of the *exoX* gene (a negative regulator of the EPS biosynthesis in rhizobia). Therefore, it is possible that the *nrcR* mutant shows higher capacity of exportation of EPS than the parental strain.

Moreover, a mutation in the *nrcR* gene provoked a clear change in the number and decoration of the NFs synthesized, especially under saline conditions (Tables 2–4). It has been established that CIAT 899 is a host-promiscuous strain that shows high tolerance of environmental stresses [19–22]. Interestingly, the synthesis of a large variety of NFs from *R. tropici* CIAT 899 has been related to both features [23–30]. In contrast, qRT-PCR experiments showed decreases in the relative expression of the *nodC* gene in the *nrcR* mutant in comparison to that of the parental strain in the presence both of apigenin and of salt (Fig 3). Nevertheless, *nodC* expression in the mutant strain supplemented with apigenin or salt were 9.5-fold and 9-fold respectively higher than in the parental CIAT 899 strain grown without inducers, confirming that the *nrcR* mutant is able to synthesize NFs. Consequently, the *nrcR::Ω* strain could decrease the quantity of NFs but increasing their diversity in comparison to those produced by the parental strain.

The role of the NrcR transcriptional regulator in the symbiosis was also confirmed in nodulation tests with common bean and leucaena. The main effect was observed in the early steps of nodulation, with absence of nodules at 15 days of inoculation with the mutant strain (Fig 4). In addition, when co-inoculated with the wild-type strain, nodule occupancy by the mutant was far lower, possibly related to a lower root-colonization capacity (Fig 5). Competitiveness is critical under field conditions to the success or failure of introduced inoculant strains [54–59]. Furthermore, certain symbiosis-related phenotypes, such as motility or EPS production, can also affect bacterial competitiveness [60, 61]. It has been described that the mutation on the *exoA* gene, decreasing EPS production, increases the competitiveness of *S. fredii* HH103 for soybean nodulation [52]. Therefore, we may suppose that decreased competitiveness of the *nrcR* mutant strain is related to the EPS over-production caused by the mutation. Lastly, the *nrcR* *in trans* complementation [*nrcR::Ω* (pMUS1333)] did not restore the capacity of nodulating bean and leucaena, because the strain lost the pMUS1333 plasmid, as demonstrated after the re-isolation of bacteria from nodules. However, the *in cis* complementation of the mutant strain [*nrcR::Ω* (pMUS1353)] restored the symbiotic phenotype (Table 5).

In summary, NrcR is a global regulatory protein that responds to environmental factors and regulates the expression of intracellular metabolic genes [62, 63]. We hypothesize that the high tolerance of *R. tropici* CIAT 899 to environmental stresses is coordinated by a complex mechanism involving a broad range of transcriptional regulators. Evolution would have selected some of these regulators, such as the NrcR protein, to regulate nodulation and other features such as EPS production and motility even when *nod*-gene inducing molecules are limited. Therefore, the NrcR transcriptional regulator may represent an important strategy of CIAT 899 to succeed as a symbiont in stressing tropical conditions. In this context, the higher EPS production and motility detected in the *nrcR* mutant may represent an additional protective mechanism for tolerating abiotic stresses. Moreover, symbiotic behavior of the mutant could also represent an indirect effect of these protective mechanisms, affecting probably the early steps of nodulation. The activation of this transcriptional regulator seems to be dependent on flavonoids or salt. Therefore, our results suggest that NrcR is a significant component in the regulatory network present in *R. tropici* CIAT 899, which is necessary for orchestration of the symbiotic machinery and other important processes such as tolerance of abiotic stresses.

## Supporting Information

**S1 Fig.** (A) Gene neighborhood of *nrcR* gene in the pRtrCIAT899c of *R. tropici* CIAT 899 genome. (B) *Hind*III endonuclease point and primers nolR-like-F and nolR-like-R location (C)

Mutant interposon insertion.  
(TIF)

**S2 Fig. Alignment of NolR, ArsR and NrcR amino acid sequences using the ClustalW online platform and manipulated with Boxshade at EMBnet.** Black and gray boxes indicate identical and similar amino acids, respectively. (A) Complete sequence alignment of NolR of *S. fredii* HH103, and NolR, ArsR and NrcR proteins of *R. tropici* CIAT 899. (B) Putative DNA-binding domain of NolR of *S. fredii* HH103, and NolR and NrcR of *R. tropici* CIAT 899.  
(TIF)

**S3 Fig. Mucous halo observed in surface motility of *R. tropici* CIAT 899 assays on TY supplemented with 0.4% agar.** (A) CIAT 899. (B) *nrcR::Ω* mutant.  
(TIF)

**S1 Table.**  
(PDF)

## Acknowledgments

We thank the Servicio de Espectrometría de Masas, Servicio de Resonancia Magnética Nuclear and Servicio de Biología of the Centro de Investigación Tecnología e Innovación (CITIUS) of the University of Seville for technical support.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MM MH FJO. Performed the experiments: PdC AAPR-S RV-F DFG FPM RAB AG-S. Analyzed the data: PdC AAPR-S RV-F DFG FPM MM MH RAB AG-S FJO. Contributed reagents/materials/analysis tools: MM MH FJO. Wrote the paper: PdC FPM AG-S MM MH FJO.

## References

1. Hungria M, Johnston AWB, Phillips DA. Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris*) on *nodD*-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Mol Plant-Microbe Interact*. 1992; 5: 199–203. doi: [10.1094/MPMI-5-199](https://doi.org/10.1094/MPMI-5-199) PMID: [1421508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1421508/)
2. Hungria M, Phillips DA. Effects of a seed color mutation on rhizobial *nod*-gene-inducing flavonoids and nodulation in common bean. *Mol Plant Microbe Interact*. 1993; 6: 418–422. doi: [10.1094/MPMI-6-418](https://doi.org/10.1094/MPMI-6-418)
3. Denarié J, Debellé F, Promé JC. *Rhizobium* lipo-chitinoligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Ann Rev Biochem*. 1996; 65: 503–535. doi: [10.1146/annurev.bi.65.070196.002443](https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002443) PMID: [8811188](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8811188/)
4. Schlaman HRM, Phillips DA, Kondorosi E. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. In Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ, editors. *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers; 1998. pp. 361–386.
5. Geurts R, Bisseling T. *Rhizobium* Nod factor perception and signalling. *Plant Cell. Supplement* 2002; S239–S249. doi: [10.1105/tpc.002451](https://doi.org/10.1105/tpc.002451)
6. Brenic A, Winans SC. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005; 69: 155–194. doi: [10.1128/MMBR.69.1.155-194.2005](https://doi.org/10.1128/MMBR.69.1.155-194.2005) PMID: [15755957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15755957/)
7. Ormeño-Orrillo E, Hungria M, Martínez-Romero E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. In Rosenberg E, DeLong EF, Stackebrandt E, Lory S, Thompson F, editors. *The Prokaryotes: prokaryotic physiology and biochemistry*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013. pp. 427–451.
8. Spaink HP. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2000; 54: 257–288. doi: [10.1146/annurev.micro.54.1.257](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.257) PMID: [11018130](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11018130/)
9. Oldroyd GE. Speak, friend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol*. 2013; 11: 252–263. doi: [10.1038/nrmicro2990](https://doi.org/10.1038/nrmicro2990) PMID: [23493145](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23493145/)

10. Shi W, Wu J, Rosen BP. Identification of a putative metal binding site in a new family of metalloregulatory proteins. *J Biol Chem*. 1994; 269: 19826–19829. PMID: [8051064](#)
11. Kiss E, Mergaert P, Oláh B, Kereszt A, Staehelin C, Davies AE, et al. Conservation of *nolR* in the *Sinorhizobium* and *Rhizobium* genera of the *Rhizobiaceae* family. *Mol Plant Microbe Interact*. 1998; 11: 1186–1195. doi: [10.1094/MPMI.1998.11.12.1186](#)
12. Osman D, Cavet JS. Bacterial metal-sensing proteins exemplified by ArsR-SmtB family repressors. *Nat Prod Rep*. 2010; 27: 668–680. doi: [10.1039/b906682a](#) PMID: [20442958](#)
13. Kondorosi E, Gyuris J, Schmidt J, John M, Duda E, Hoffmann B, et al. Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO J*. 1989; 8: 1331–1340. PMID: [16453883](#)
14. Kondorosi E, Pierre M, Cren M, Haumann U, Buire M, Hoffmann B, et al. Identification of *NolR*, a negative transacting factor controlling the *nod* regulon in *Rhizobium meliloti*. *J Mol Biol*. 1991; 222: 885–896. doi: [10.1016/0022-2836\(91\)90583-R](#) PMID: [1840615](#)
15. Cren M, Kondorosi A, Kondorosi E. *NolR* controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factor synthesis. *Mol Microbiol*. 1995; 15: 733–747. doi: [10.1111/j.1365-2958.1995.tb02381.x](#) PMID: [7783644](#)
16. Lee SG, Krishnan HB, Jez JM. Structural basis for regulation of rhizobial nodulation and symbiosis gene expression by the regulatory protein *NolR*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111: 6509–6514. doi: [10.1073/pnas.1402243111](#) PMID: [24733893](#)
17. Vinardell JM, Ollero FJ, Hidalgo A, López-Baena FJ, Medina C, Ivanov-Vangelov K, et al. *NolR* regulates diverse symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. *Mol Plant Microbe Interact*. 2004; 17: 676–685. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.6.676>. PMID: [15195950](#)
18. Sugawara M, Sadowsky MJ. Enhanced nodulation and nodule development by *nolR* mutants of *Sinorhizobium medicae* on specific *Medicago* host genotypes. *Mol Plant Microbe Interact*. 2014; 27: 328–335. doi: [10.1094/MPMI-10-13-0312-R](#) PMID: [24283939](#)
19. Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J Syst Bacteriol*. 1991; 41: 417–426. doi: [10.1099/00207713-41-3-417](#) PMID: [1715738](#)
20. Hernández-Lucas I, Segovia L, Martínez-Romero E, Pueppke SG. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl Environ Microbiol*. 1995; 61: 2775–2779. PMID: [7618891](#)
21. Pinto FGS, Hungria M, Mercante FM. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol Biochem*. 2007; 39: 1851–1864. doi: [10.1016/j.soilbio.2007.01.001](#)
22. Hungria M, Andrade DS, Chueire LMO, Probanza A, Gutiérrez-Mañero FJ, Megías M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol Biochem*. 2000; 21: 1515–1528. doi: [10.1016/S0038-0717\(00\)00063-8](#)
23. Poupot R, Martínez-Romero E, Promé JC. Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentaccharides containing an *N*-methyl-*N*-acylglucosaminyl terminus. *Biochemistry*. 1993; 32: 10430–10435. doi: [10.1021/bi00090a019](#) PMID: [8399187](#)
24. Marks BB, Megías M, Ollero FJ, Nogueira MA, Araujo RS, Hungria M. Maize growth promotion by inoculation with *Azospirillum brasilense* and metabolites of *Rhizobium tropici* enriched on lipo-chitooligosaccharides (LCOs). *AMB Express*. 2015; 5: 71. doi: [10.1186/s13568-015-0154-z](#) PMID: [26567001](#)
25. Morón B, Soria-Díaz ME, Ault J, Verroios G, Noreen S, Rodríguez-Navarro DN, et al. Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT 899. *Chem Biol*. 2005; 12: 1029–1040. doi: [10.1016/j.chembiol.2005.06.014](#) PMID: [16183027](#)
26. Estévez J, Soria-Díaz ME, de Córdoba FF, Morón B, Manyani H, Gil A, et al. Different and new Nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT 899 following Na<sup>+</sup> stress. *FEMS Microbiol Lett*. 2009; 293: 220–231. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01540.x>. doi: [10.1111/j.1574-6968.2009.01540.x](#) PMID: [19260963](#)
27. Guasch-Vidal B, Estévez J, Dardanelli MS, Soria-Díaz ME, de Córdoba FF, Balog CIA, et al. High NaCl concentrations induce the *nod* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899 in the absence of flavonoid inducers. *Mol Plant Microbe Interact*. 2013; 26: 451–460. doi: [10.1094/MPMI-09-12-0213-R](#) PMID: [23216086](#)
28. van Hameren B, Hayashi S, Gresshoff PM, Ferguson BJ. Advances in the identification of novel factors required in soybean nodulation, a process critical to sustainable agriculture and food security. *J Plant Biol Soil Health*. 2013; 1: 6.
29. del Cerro P, Rolla-Santos AAP, Gomes DF, Marks B, Pérez-Montaño F, Rodríguez-Carvajal MA, et al. Regulatory *nodD1* and *nodD2* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 and their roles in the early

- stages of molecular signaling and host-legume nodulation. BMC Genomics. 2015; 16: 251. doi: [10.1186/s12864-015-1458-8](https://doi.org/10.1186/s12864-015-1458-8) PMID: [25880529](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25880529/)
30. del Cerro P, Rolla-Santos AAP, Gomes DF, Marks B, Espuny MR, Rodríguez-Carvajal MA, et al. Opening the "black box" of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899. BMC Genomics. 2015; 16: 864. doi: [10.1186/s12864-015-2033-z](https://doi.org/10.1186/s12864-015-2033-z) PMID: [26502986](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26502986/)
31. Ormeño-Orrillo E, Menna P, Gonzaga LA, Ollero FJ, Nicolas MF, Rodrigues EP, et al. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). BMC Genomics. 2012; 13: 735. doi: [10.1186/1471-2164-13-735](https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-735) PMID: [23270491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23270491/)
32. Beringer J E. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol. 1974; 84: 188–198. doi: [10.1099/00221287-84-1-188](https://doi.org/10.1099/00221287-84-1-188) PMID: [4612098](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4612098/)
33. Spaink HP, Aarts A, Stacey G, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ, Kennedy EP. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using thin-layer chromatography. Mol Plant Microbe Interact. 1992; 5: 72–80. doi: [10.1094/MPMI-5-072](https://doi.org/10.1094/MPMI-5-072) PMID: [1600238](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1600238/)
34. Vincent JM. The modified Fåhræus slide technique. In Vincent JM, editor. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, UK. Blackwell Scientific Publications; 1970. pp. 144–145.
35. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY USA. 1989.
36. Lamrabet Y, Bellogín RA, Cubo T, Espuny MR, Gil-Serrano A, Krishnan HB, et al. Mutation in GDP-fucose synthesis genes of *Sinorhizobium fredii* alters Nod factors and significantly decreases competitiveness to nodulate soybeans. Mol Plant Microbe Interact. 1999; 12: 207–217. doi: [10.1094/MPMI.1999.12.3.207](https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.3.207) PMID: [10065558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10065558/)
37. Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene. 1994; 145: 69–73. doi: [10.1016/0378-1119\(94\)90324-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90324-7) PMID: [8045426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8045426/)
38. Simon R. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vivo constructed Tn5-Mob transposon. Mol Gen Genet. 1984; 196: 413–420. PMID: [6094969](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6094969/)
39. Figurski DH, Helinski DR. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc Natl Acad Sci USA. 1979; 76: 1648–1652. doi: [10.1073/pnas.76.4.1648](https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1648) PMID: [377280](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/377280/)
40. López-Baena FJ, Vinardell JM, Pérez-Montaña F, Crespo-Rivas JC, Bellogín RA, Espuny MR, et al. Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. Microbiology-SGM. 2008; 154: 1825–1836. doi: [10.1099/mic.0.2007/016337-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/016337-0)
41. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene. 1995; 166: 175–176. doi: [10.1016/0378-1119\(95\)00584-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00584-1) PMID: [8529885](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8529885/)
42. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nat. protocols. 2015; 10: 845–858. doi: [10.1038/nprot.2015.053](https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053) PMID: [25950237](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25950237/)
43. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezukh Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: A better web interface. Nucleic Acids Res. 2008; 36: W5–9. doi: [10.1093/nar/gkn201](https://doi.org/10.1093/nar/gkn201) PMID: [18440982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18440982/)
44. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. ClustalW and ClustalX version 2. Bioinformatics. 2007; 23: 2947–2948. doi: [10.1093/bioinformatics/btm404](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404) PMID: [17846036](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17846036/)
45. Pérez-Montaña F, Jiménez-Guerrero I, Del Cerro P, Baena-Ropero I, López-Baena FJ, Ollero FJ, et al. The symbiotic biofilm of *Sinorhizobium fredii* SMH12, necessary for successful colonization and symbiosis of *Glycine max* cv Osumi, is regulated by Quorum Sensing systems and inducing flavonoids via NodD1. PLoS One. 2014; 9: e105901. doi: [10.1371/journal.pone.0105901](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105901) PMID: [25166872](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25166872/)
46. Tomlinson AD, Ramey-Hartung B, Day TV, Merrit PM, Fuqua C. *Agrobacterium tumefaciens* ExoR represses succinoglycan biosynthesis and is required for biofilm formation and motility. Microbiology-SGM. 2010; 156: 2670–2681. doi: [10.1099/mic.0.039032-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.039032-0)
47. Gomes DF, Batista JSS, Rolla AAP, Silva LPS, Bloch C, Galli-Terasawa LV, et al. Proteomic analysis of free-living *Bradyrhizobium diazoefficiens*: highlighting potential determinants of a successful symbiosis. BMC Genomics. 2014; 15: 643. doi: [10.1186/1471-2164-15-643](https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-643) PMID: [25086822](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25086822/)
48. Kearns DB. A field guide to bacterial swarming motility. Nat Rev Microbiol. 2010; 8: 634–644. doi: [10.1038/nrmicro2405](https://doi.org/10.1038/nrmicro2405) PMID: [20694026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20694026/)

49. Downie JA. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev.* 2010; 34: 150–170. doi: [10.1111/j.1574-6976.2009.00205.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00205.x) PMID: [20070373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20070373/)
50. Janczarek M. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *Int J Mol Sci.* 2011; 12: 7898–7933. doi: [10.3390/ijms12117898](https://doi.org/10.3390/ijms12117898) PMID: [22174640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22174640/)
51. Gil-Serrano A, Sánchez del Junco A, Tejero-Mateo P, Megías M, Caviedes MA. Structure of the extracellular polysaccharide secreted by *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CIAT 899. *Carbohydr Res.* 1990; 204: 103–107. doi: [10.1016/0008-6215\(90\)84025-P](https://doi.org/10.1016/0008-6215(90)84025-P) PMID: [2279241](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2279241/)
52. Rodríguez-Navarro DN, Rodríguez-Carvajal MA, Acosta-Jurado S, Soto MJ, Margaret I, Crespo-Rivas JC, et al. Structure and Biological Roles of *Sinorhizobium fredii* HH103 Exopolysaccharide. *PLoS One.* 2014; 9: e115391. doi: [10.1371/journal.pone.0115391](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115391) PMID: [25521500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25521500/)
53. Geniaux E, Flores M, Palacios R, Martinez E. Presence of Megaplasms in *Rhizobium tropici* and Further Evidence of Differences between the Two *R. tropici* Subtypes. *Int J Syst Bacteriol.* 1995; 45: 392–394. doi: [10.1099/00207713-45-2-392](https://doi.org/10.1099/00207713-45-2-392)
54. Streeter JG. Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. *Can J Microbiol.* 1994; 40: 513–522. doi: [10.1139/m94-084](https://doi.org/10.1139/m94-084)
55. Toro N. Nodulation competitiveness in the *Rhizobium* legume symbiosis. *World J Microbiol Biotechnol.* 1996; 12: 157–162. doi: [10.1007/BF00364680](https://doi.org/10.1007/BF00364680) PMID: [24415163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24415163/)
56. Triplett EW, Sadowsky MJ. Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annu Rev. Microbiol.* 1992; 46: 399–428. doi: [10.1146/annurev.mi.46.100192.002151](https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.002151) PMID: [1444262](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1444262/)
57. Vargas MAT, Mendes IC, Hungria M. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and nitrogen fertilization in two Cerrado soils. *Biol Fertil Soils.* 2000; 32: 228–233. doi: [10.1007/BF02197490](https://doi.org/10.1007/BF02197490)
58. Hungria M, Campo RJ, Chueire LMO, Grange L, Megías M. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. *Biol Fertil Soils.* 2001; 33: 387–394. doi: [10.1007/s003740100338](https://doi.org/10.1007/s003740100338)
59. Mendes IC, Vargas MAT, Hungria M. Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* in a Brazilian Cerrados oxisol. *Biol Fertil Soils.* 2004; 40: 28–35. doi: [10.1007/s00374-004-0739-1](https://doi.org/10.1007/s00374-004-0739-1)
60. Liu R, Tran VM, Schmidt EL. Nodulating competitiveness of a nonmotile Tn7 mutant of *Bradyrhizobium japonicum* in nonsterile soil. *Appl Environ Microbiol.* 1989; 55: 1895–1900. PMID: [16347986](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16347986/)
61. McDermoti TR, Graham PH. Competitive ability and efficiency in nodule formation of strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl Environ Microbiol.* 1990; 56: 3035–3039. PMID: [16348311](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16348311/)
62. Chen H, Higgins J, Kondorosi E, Kondorosi A, Djordjevic MA, Weinman JJ, et al. Identification of *nolR*-regulated proteins in *Sinorhizobium meliloti* using proteome analysis. *Electrophoresis* 2000; 21: 3823–3832. doi: [10.1002/1522-2683\(200011\)21:17](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200011)21:17) PMID: [11271500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11271500/)
63. Chen H, Gao K, Kondorosi E, Kondorosi A, Rolfe BG. Functional genomic analysis of global regulator *NolR* in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2005; 18: 1340–1352. doi: [10.1094/MPMI-18-1340](https://doi.org/10.1094/MPMI-18-1340) PMID: [16478054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16478054/)
64. Spaik HP. Rhizobial lipo-oligosaccharides: Answers and questions. *Plant Mol Biol.* 1992; 20: 977–986. doi: [10.1007/BF00027167](https://doi.org/10.1007/BF00027167) PMID: [1463833](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1463833/)



# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner

Pablo del Cerro<sup>1</sup>, Francisco Pérez-Montañó<sup>1</sup>, Antonio Gil-Serrano<sup>2</sup>,  
Francisco Javier López-Baena<sup>1</sup>, Manuel Megías<sup>1</sup>, Mariangela Hungria<sup>3</sup>  
& Francisco Javier Ollero<sup>1</sup>

Received: 05 December 2016

Accepted: 23 March 2017

Published: 10 May 2017

In the symbiotic associations between rhizobia and legumes, NodD promotes the expression of the nodulation genes in the presence of appropriate flavonoids. This set of genes is implied in the synthesis of Nodulation factors, which are responsible for launching the nodulation process. *Rhizobium tropici* CIAT 899 is the most successful symbiont of *Phaseolus vulgaris* and can nodulate a variety of legumes. This strain produces Nodulation factors under abiotic stress such as acidity or high concentration of salt. Genome sequencing of CIAT 899 allowed the identification of five *nodD* genes. Whereas NodD1 is essential to nodulate *Leucaena leucocephala*, *Lotus japonicus* and *Macroptilium atropurpureum*, symbiosis with *P. vulgaris* and *Lotus burtii* decreased the nodule number but did not abolish the symbiotic process when NodD1 is absent. Nodulation factor synthesis under salt stress is not regulated by NodD1. Here we confirmed that NodD2 is responsible for the activation of the CIAT 899 symbiotic genes under salt stress. We have demonstrated that NodD1 and NodD2 control the synthesis of the Nod factor necessary for a successful symbiosis with *P. vulgaris* and *L. burtii*. This is the first time that NodD is directly implied in the activation of the symbiotic genes under an abiotic stress.

Flavonoids are phenylpropanoid metabolites exuded from plant roots, often in response to elicitors generated by microorganisms present in the rhizosphere<sup>1</sup>. These molecules are antimicrobial compounds that inhibit growth of bacterial and fungal root pathogens<sup>2</sup>. However, in rhizobia, flavonoids act as bacterial growth promoters, chemoattractants, inducers of nodulation genes, determinants of host specificity, and regulators of phytoalexin resistance<sup>3</sup>. Rhizobia establish symbiotic associations with leguminous plants, evolving fine tuning events that culminate in the formation of nodules and the fixation of the atmospheric nitrogen (N<sub>2</sub>) into ammonia<sup>4</sup>. Thus, rhizobia have managed to reorient the biotic stress caused by flavonoids towards the symbiotic process. This adaptation is mediated by the NodD protein, a LysR-type transcriptional regulator constitutively expressed that promotes the expression of the nodulation genes (*nod* genes) in the presence of appropriate flavonoids by binding to conserved promoter regions (*nod* boxes, NB) located upstream of these genes<sup>5–9</sup>. The *nod* genes, located in the symbiotic plasmid of rhizobia, are implied in the synthesis of lipochitooligosaccharides, also known as Nod factors (NF), which are responsible for launching the nodulation process<sup>10,11</sup>. Besides, other transcriptional regulators such as NodR, SyrM and NrcR also take part in the regulation of the *nod* genes<sup>12–15</sup>. In *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, flavonoid perception triggers transient increases in the concentration of intracellular calcium (Ca<sup>2+</sup>), which is essential for subsequent induction of the *nod* genes<sup>16</sup>. Interestingly, these Ca<sup>2+</sup> transient peaks also occur in response to nitrogen starvation and environmental stresses in other prokaryotes<sup>17</sup>.

*Rhizobium tropici* CIAT 899 (hereafter CIAT 899) is the most successful symbiont of *Phaseolus vulgaris* (common bean) in tropical acid soils; it is also very promiscuous and capable of nodulating with a variety of legumes,

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain. <sup>2</sup>Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain. <sup>3</sup>Embrapa Soja, Londrina, Paraná, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.J.O. (email: fjom@us.es)

with an emphasis on *Leucaena* spp.<sup>18,19</sup>. Genome sequencing of CIAT 899 allowed the identification of five different *nodD* genes and three different *nodA* genes in the symbiotic plasmid. The *nodD1* gene codes for the main activator of NF synthesis and is located adjacent to the *nodA1BC* operon<sup>20</sup>. Mutation of each *nodD* gene revealed that only *nodD1* is essential to nodulate *Leucaena leucocephala*, *Lotus japonicus* and *Macroptilium atropurpureum*. However, symbiosis with *P. vulgaris* and *L. burtii* is not blocked when the *nodD1* gene is mutated, indicating the existence of a complex symbiotic regulatory circuit in this bacterium<sup>21,22</sup>. Otherwise, the mutation in the *nodD2* gene provoked a significant decrease in nodule number in *P. vulgaris*, suggesting the putative implication of NodD2 in the symbiotic process<sup>21,22</sup>.

Main features of this broad host-range rhizobial strain include its high tolerance to environmental stresses such as high temperature, acidity and salinity<sup>18,19,23</sup>, and its capacity to produce a large variety of NF<sup>24</sup>. Surprisingly, CIAT 899 is able to produce these symbiotic molecules even in the absence of flavonoids under abiotic stress conditions such as acidity or high concentration of salt<sup>25–27</sup>. Interestingly, a transcriptomic analysis of CIAT 899 grown in the presence of apigenin (a CIAT 899 inducer flavonoid) or salt showed similarities in gene activation patterns not only for the *nod* genes, but also for other important symbiotic genes located downstream of their respective NB: *nodA1BCSUIJH* (NB1), *nodA2hsnTnodFE* (NB2), *nodM* (NB3), *y4wEF* (NB4) and two genes with still unknown functions (NB5). For this reason, the salt-dependent production of these symbiotic molecules could suggest a strategy of CIAT 899 to ensure nodulation under salt stress conditions<sup>28</sup>. Curiously, NF synthesis under salt stress is not regulated by NodD1<sup>27</sup>. However, the protein or proteins responsible for the activation of the *nod* genes in the presence of saline stress are currently unknown.

In this paper, we have unequivocally identified for the first time that a NodD protein (NodD2) is implied in the transcriptional activation of the nodulation genes under salt stress conditions in a flavonoid-independent manner. Besides, we have also demonstrated that both NodD1 and NodD2 control the entire NF synthesis in CIAT 899 and are necessary for a successful symbiosis with *P. vulgaris* and *L. burtii*.

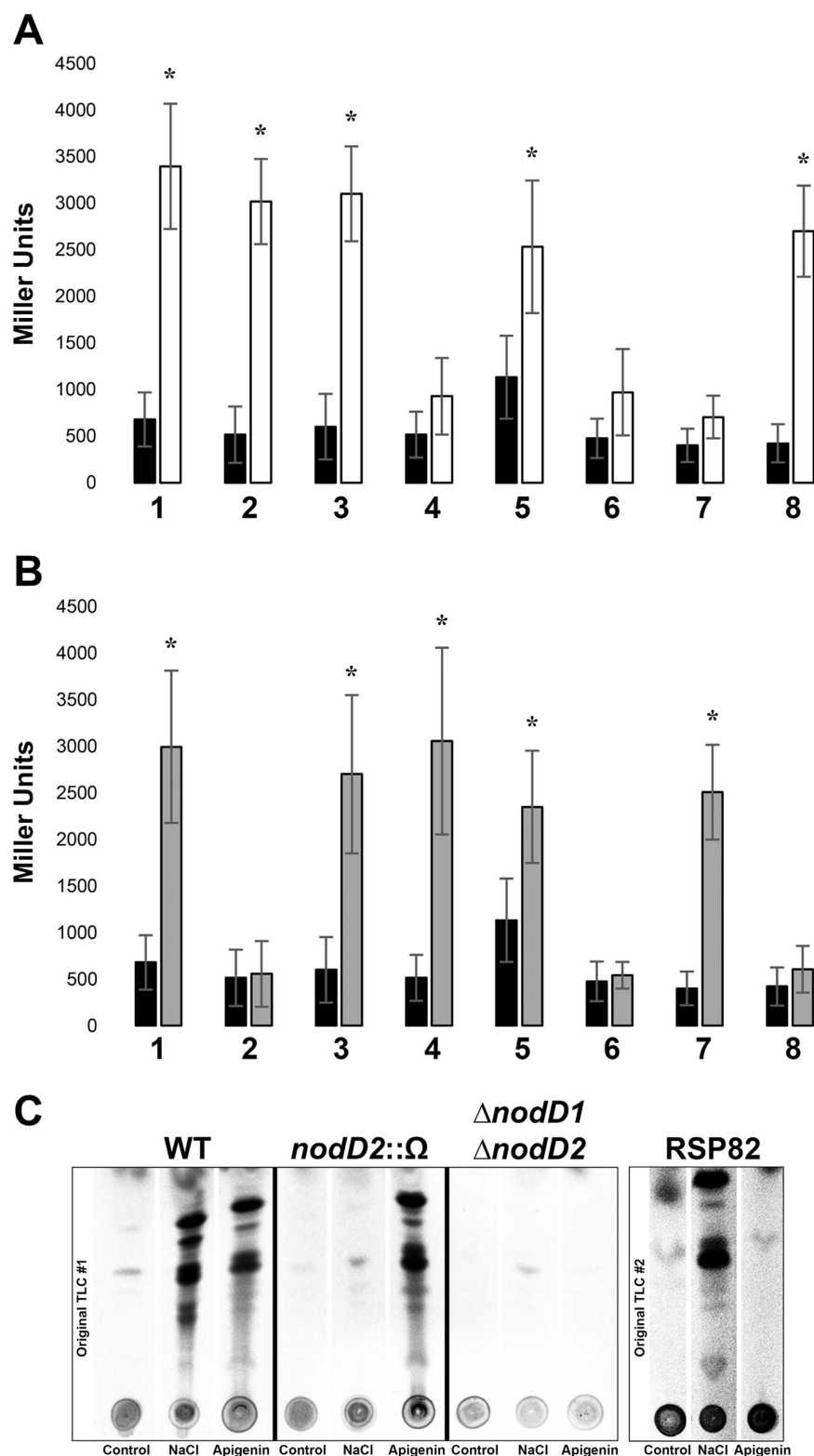
## Results

**Mutation on the *nodD2* gene abolishes *nod* gene induction and the biosynthesis of NF under salt stress.** As previously mentioned, Guasch-Vidal *et al.*<sup>27</sup> demonstrated that even in the absence of inducer flavonoids, CIAT 899 was able to induce the synthesis of NF under salt stress conditions in a *nodD1*-independent manner. However, this bacterium harbours other four copies of the *nodD* gene in the symbiotic plasmid<sup>20</sup> that could be responsible for *nod* genes activation in the presence of salt.

To determine which of these five *nodD* genes induces the synthesis of NF under salt stress condition, plasmid pMP240 harbouring the *nodA* promoter of *R. leguminosarum* bv. *viciae* fused to the *lacZ* gene was transferred by conjugation to the CIAT 899 wild-type strain and to the *nodD* mutant derivative strains (Table S1).  $\beta$ -galactosidase assays showed similar activation levels in the presence of NaCl (300 mM) in all strains (Figure S2), with the exception of the strain affected in *nodD2* (*nodD2::Ω*), in which the up-regulation of the *nodA* gene was only detected in cultures supplemented with apigenin but not in the presence of salt (Fig. 1A). To confirm these results, the *nodD2* gene was also mutated by in-frame deletion ( $\Delta$ *nodD2*) and the expression of the *nodA* gene was neither detected in this strain carrying plasmid pMP240 (data not shown). With respect to the *nodD1* mutant strain (RSP82) *nodA* activation was only detected in the presence of salt (Fig. 1A). As described in the materials and methods section, both mutant strains (RSP82 and *nodD2::Ω*) were complemented *in trans* and the complementation restored the wild-type  $\beta$ -galactosidase levels in apigenin and salt conditions, respectively (Fig. 1). These results suggest that NodD2 could be activating NF synthesis in the presence of salt in a pathway independent to those mediated by apigenin and NodD1. For this reason,  $\beta$ -galactosidase activity was also measured in the presence of both inducing molecules in a double  $\Delta$ *nodD1*/ $\Delta$ *nodD2* mutant carrying plasmid pMP240. As expected, no induction of the *nod* genes in any assayed condition was detected. The double mutant was also complemented separately with the *nodD1* or the *nodD2* wild-type genes restoring the expression of *nodA* in the presence of apigenin or salt, respectively, confirming the results commented above (Fig. 1). There was still a residual *nodA* induction in the RSP82 strain in the presence of apigenin, the *nodD2::Ω* mutant in the presence of salt, and in the  $\Delta$ *nodD1*/ $\Delta$ *nodD2* mutant in the presence of salt, but they were not statistically significant (Fig. 1).

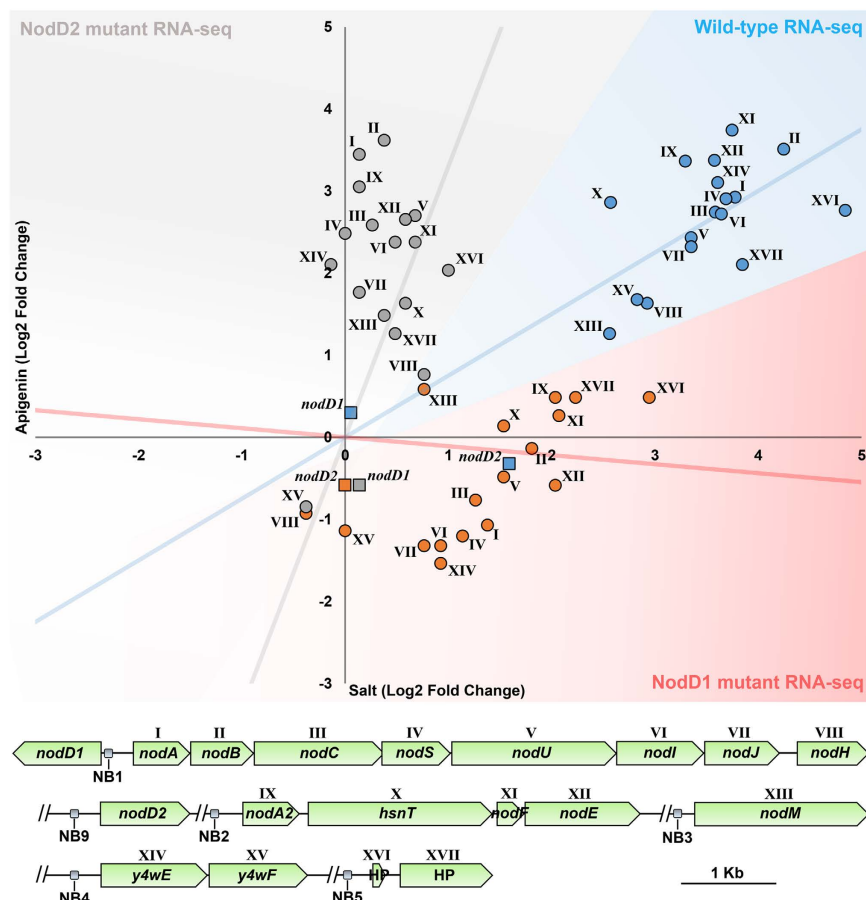
The correlation between up-regulation of *nodA* expression and synthesis of NF was also demonstrated by reversed-phase thin layer chromatography (RP-TLC). The NF profiles of the wild-type, *nodD2* (*nodD2::Ω*) and  $\Delta$ *nodD1*/ $\Delta$ *nodD2* mutant strains were obtained by marking with <sup>14</sup>C and further purification of these symbiotic molecules. Results obtained showed that NF production was abolished in the presence of high concentrations of salt when NodD2 was absent, while the double  $\Delta$ *nodD1*/ $\Delta$ *nodD2* mutant did not produce NF in the presence of apigenin and under saline conditions (Fig. 1C). Therefore, these results confirm that NodD2 mediates the synthesis of NF in CIAT 899 under salt stress.

**RNA-seq analysis indicates that symbiotic genes are transcriptionally activated by NodD1 in the presence of apigenin and by NodD2 under salt stress.** Plasmid pMP240 is a useful tool to measure the transcriptional activation of the *nodA* gene implied in NF synthesis. However, in our previous transcriptomic study of CIAT 899, at least 17 genes located in the symbiotic plasmid and controlled by 5 different NB are over-expressed in the presence of both inducer molecules apigenin and salt (Fig. 2)<sup>28</sup>. For this reason, to determine whether transcriptional activation of all these *nod* genes and the symbiotic-related genes under salt stress conditions is mediated by NodD2, 12 RNA-seq libraries were generated from wild-type, *nodD1* (RSP82 strain) and *nodD2* (*nodD2::Ω*) mutant strains grown in the presence or absence of apigenin (3.7  $\mu$ M) and salt (NaCl 300 mM) (two independent biological experiments for each condition). Quality control of each run, sample normalizations and statistical procedures were performed as previously described<sup>28</sup> (Supplementary File 3). Differentially expressed genes for each strain and condition were obtained by comparing with gene expression



**Figure 1.**  $\beta$ -galactosidase activity of *R. tropici* CIAT 899 (1), RSP82 (*nodD1* mutant) (2), RSP82 (pMUS1398) (3), *nodD2::\Omega* (4), *nodD2::\Omega* (pMUS1396) (5),  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$  (6),  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$  (pMUS1397) (7) and  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$  (pMUS1395) (8) strains carrying plasmid pMP240 which contains the *R. leguminosarum* bv. *viciae* *nodA* promoter fused to the *lacZ* gene. Assayed conditions were YM medium (Control, black bars) YM supplemented with 300 mM NaCl (NaCl, white bars, (A)) and YM supplemented with 3.7  $\mu$ M apigenin (Apigenin, gray bars, (B)). Strain parameters were individually compared with CIAT 899 grown in YM medium by using the Mann-Whitney non-parametric test. Values tagged by asterisks (\*) are significantly different at the level of  $\alpha = 5\%$  (C). Thin-layer chromatography analysis of Nod factors produced by *R. tropici* CIAT 899 (1), RSP82 (2), *nodD2::\Omega* (4) and  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$  (6) strains in the presence of  $^{14}$ C-labeled N-acetyl glucosamine.





**Figure 2.** Scatterplot of the log<sub>2</sub>-transformed fold-change values of the *R. tropici* CIAT 899 *nod* genes and symbiotic-related genes obtained in the RNA-seq assay. Vertical and horizontal axis represent the values obtained in apigenin and salt conditions respectively. Nodulation genes were numbered with roman numerals (I to XVII) and represented in the Scatterplot. Blue circles represent the log<sub>2</sub>-transformed fold-change in our previous RNA-seq study of *R. tropici* CIAT 899 (Pérez-Montaño *et al.*<sup>28</sup>). Red circles represent the log<sub>2</sub>-transformed fold-change levels observed in RNA-seq of the *nodD1* mutant. Gray circles represent the log<sub>2</sub>-transformed fold-change values observed in the RNA-seq of the *nodD2* mutant. Values of the *nodD1* and *nodD2* genes are also present as squares and tagged with the own name of the gene. Trend lines of each RNA-seq assay are represented with its corresponding color. Black bar length = 1 Kb.

levels of the wild-type strain grown under control conditions (Supplementary File 4). Data set was validated by qRT-PCR, obtaining in all cases positive correlation degrees in fold-change values between the qRT-PCR and the RNA-seq data (Supplementary File 5).

Focusing attention on these 17 genes, RNA-seq experiments indicated that their transcriptional activation was only detected in cultures supplemented with salt in the *nodD1* mutant background or apigenin in the case of the *nodD2* mutant background (Fig. 2), confirming the role of NodD2 in the transcriptional activation of these symbiotic genes under salt stress. Analysis of the induction values of each set of genes controlled by NB pointed to another interesting finding, the fold-change values of all symbiotic genes for the *nodD1* mutant in the presence of salt were lower than those observed for the wild-type strain in the same condition (Table 1). Indeed, two groups of symbiotic genes, *nodM* (NB3) and *y4wEF* (NB4) did not reach the threshold of induction values established for this study ( $\pm 3$  fold-change). This could be explained due to the fact that in the wild-type strain the expression of *nodD2* (NB9) was slightly up-regulated in the presence of salt but not in the presence of apigenin, which may suggest an initial role of NodD1 in the promotion of the transcriptional activation of *nodD2* under salt stress. Finally, the expression of *nrcR* transcriptional regulator, which activates the *nod* genes in presence of salt conditions in *R. tropici* CIAT 899, was reduced 2.3 times in the *nodD2::Δ* salt treatment respecting to the wild-type control condition, indicating that *nodD2* may activate also the *nrcR* gene.

In summary, transcriptomic analysis revealed that NodD2 mediates the transcriptional activation of all *R. tropici* CIAT 899 symbiotic genes under salt stress in a process which could be enhanced by NodD1.

**NodD1 and NodD2 control the entire production of the *R. tropici* CIAT 899 NF implied in symbiosis with legumes.** Once unequivocally determined the key role of NodD1 and NodD2 in the biosynthesis

NB	Locus-tag (gene name)	Function	CIAT 899 salt <sup>a,b</sup>	CIAT 899 apigenin <sup>a,b</sup>	<i>nodD1</i> mutant salt <sup>a</sup>	<i>nodD1</i> mutant apigenin <sup>a</sup>	<i>nodD2</i> mutant salt <sup>a</sup>	<i>nodD2</i> mutant apigenin <sup>a</sup>
1	cds215 to 224/RTCIAT899_PB1300 to RTCIAT899_PB01340/ <i>nodABCSUIJH</i>	NF production	<b>13.66 to 7.6</b>	<b>8.73 to 3.09</b>	<b>3.46<sup>*</sup> to −1.31</b>	−2.08 to −1.94	−1.12 to −1.74	<b>10.85 to 1.73</b>
2	cds177 to 180/RTCIAT899_PB01095 to RTCIAT899_PB01110/ <i>nodA2hstnodFE</i>	NF production	<b>9.81 to 11.94</b>	<b>10.3 to 10.37</b>	<b>4.13 to 4.10</b>	1.40 to −1.51	1.07 to 1.46	<b>8.29 to 6.34</b>
3	cds450/RTCIAT899_PB02710/ <i>nodM</i>	NF production	<b>5.85</b>	2.43	1.67	−1.51	1.31	2.79
4	cds95 to 94/RTCIAT899_PB00575 to RTCIAT899_PB00565/ <i>y4wEF</i>	Synthesis of IAA	<b>12.17 to 7.11</b>	<b>8.57 to 3.2</b>	1.87 to 1.04	−2.94 to −2.22	−1.12 to −1.3	<b>4.25 to −1.83</b>
5	cds263 to 262/RTCIAT899_PB01550 to RTCIAT899_PB01545/HP	Unknown	<b>28.65 to 14.37</b>	<b>6.75 to 4.26</b>	<b>7.72 to 4.73</b>	1.36 to 1.42	1.96 to 1.42	<b>4.1 to 2.35</b>
9	cds173/RTCIAT899_PB01570/ <i>nodD2</i>	Transcriptional regulation	<b>3.01</b>	−1.25	1.02	−1.52	—	—

**Table 1. Fold-change values of the *R. tropici* CIAT 899 genes located downstream *nod* boxes.**

Transcriptional activation (3-fold induction with respect to CIAT 899 non-induced cultures) of several *nod* box controlled operons was demonstrated by RNA-seq experiments in the presence of both inducer molecules (fold-change values in bold). HP: gene that codes for a hypothetical protein. <sup>a</sup>Fold induction with respect to CIAT 899 non-induced cultures. Values correspond to fold-change values of the first and last gene of the cluster. <sup>b</sup>Data obtained from Pérez-Montaña *et al.*<sup>28</sup>. <sup>\*</sup>3.46 correspond to fold induction of the *nodB* gene.

Strains	Control	NaCl (300 mM)	Apigenin (3.7 μM)
<i>R. tropici</i> CIAT 899	12.5 ± 5.69	23.14 ± 3.48*	35.29 ± 12.88*
RSP82	4.73 ± 3.85*	13.86 ± 5.7	5.3 ± 4.05*
<i>nodD2::Ω</i>	8.33 ± 4.72	8.22 ± 4.46	41.17 ± 5.03*
$\Delta$ <i>nodD1</i> / $\Delta$ <i>nodD2</i>	0 ± 0*	0 ± 0*	0 ± 0*
none	0 ± 0*	0 ± 0*	0 ± 0*

**Table 2. Number of nodule primordia in response to inoculation of common bean with the purified Nod factors of *R. tropici* CIAT 899 and derivative strains.** Data represent means ± S.D. of six plant jars. Each jar contained one plant. *P. vulgaris* plants were evaluated 10 days after inoculation. The CIAT 899 derivatives and no inoculated parameters were individually compared with the parental strain by using the Mann-Whitney non-parametric test. Values tagged by asterisk (\*) are significantly different ( $\alpha = 5\%$ ).

of NF in the presence of both inducer molecules, the confirmation of the biological activity of these NF was evaluated. CIAT 899 produces low concentrations of NF even in the absence of apigenin or salt, being this biosynthesis strongly induced in the presence of both molecules<sup>27</sup>. Thus, it is not surprising that a single mutation of any *nod* gene does not completely abolish NF production<sup>21,22</sup>. For this reason, the NF profile was firstly determined for the  $\Delta$ *nodD1*/ $\Delta$ *nodD2* mutant by mass spectrometry. In this mutant background the production of NF was completely abolished in all conditions assayed (data not shown), indicating that NodD1 and NodD2 are crucial for the biosynthesis of NF in CIAT 899. Then, this result was confirmed by biological activity assays, in which the NF purified from cultures of CIAT 899, RSP82, *nodD2::Ω* and the  $\Delta$ *nodD1*/ $\Delta$ *nodD2* mutant strains, induced or not with apigenin or salt, were added to common bean roots as previously described<sup>27</sup> (Table 2). As expected, in the wild-type strain, nodule primordia were detected in common bean roots after 10 days post treatment, independently of the bacterial culture conditions being these primordia more abundant in those roots where the NF added were cultured in presence of any inducer. However, in the case of the double mutant strain, these symbiotic structures were not developed (Figure S6) (Table 2), presenting the common bean roots a phenotype similar to untreated plants. NF purified from the *nodD2::Ω* strain cultured in salt conditions also induced the formation of nodule primordia in *P. vulgaris* roots. However, the number of primordia was reduced 3-fold respecting the wild-type salt condition, whereas the nodule primordia observed in apigenin were similar between the wild-type and the *nodD2::Ω* strain. In turn, the number of primordia in the RSP82 strain was reduced in comparison to the wild-type, mainly in those NF purified from apigenin cultures.

Finally, once demonstrated that NodD1 and NodD2 control the entire NF production in CIAT 899, nodulation performance of the double  $\Delta$ *nodD1*/ $\Delta$ *nodD2* mutant was also evaluated in *P. vulgaris* and *L. burtii*, two plants in which the absence of NodD1 reduced the nodule number but did not abolish the symbiotic process. Results showed that after 30 and 45 days of growth, respectively, nodules were absent in those plants inoculated with the double mutant strain, in concordance with results described above (Table 3). In order to confirm these results, the double mutant strain individually complemented with the wild-type *nodD1* and *nodD2* genes was also tested in nodulation assays. The presence of nodules in *P. vulgaris* and *L. burtii* roots was detected in both cases (Table 3). Thus, the nodulation machinery and therefore the synthesis of NF in the symbiosis with legume plants fully depended on both NodD1 and NodD2 transcriptional regulators in *R. tropici* CIAT 899.

## Discussion

Flavonoids released by legume roots are crucial for the symbiotic process. These molecules are recognized by rhizobia through binding to the transcriptional regulator NodD, which triggers the expression of the *nod* genes,

Strains	<i>P. vulgaris</i> <sup>a</sup>		<i>L. burtii</i> <sup>a</sup>	
	Nodule number	Shoot dry weight (mg)	Nodule number	Shoot dry weight (mg)
<i>R. tropici</i> CIAT 899	225.67 ± 30.25	1890 ± 570	14.87 ± 5.79	46.7 ± 18.7
RSP82 <sup>b</sup>	38.11 ± 11.14*	1420 ± 350	5.14 ± 2.13*	40 ± 20
<i>nodD2::Ω</i> <sup>b</sup>	95.08 ± 38.26*	1030 ± 270	12.1 ± 5.45	30 ± 10.1
$\Delta nodD1/\Delta nodD2$	0 ± 0*	560 ± 190*	0 ± 0*	8.7 ± 3.8*
$\Delta nodD1/\Delta nodD2$ (pMUS1397)	109.41 ± 33.47*	1180 ± 310	10 ± 4.22	38 ± 19.2
$\Delta nodD1/\Delta nodD2$ (pMUS1395)	56.5 ± 16.03*	1220 ± 390	8 ± 4.89	32 ± 14.9
none	0 ± 0*	500 ± 40*	0 ± 0*	4.8 ± 1.3*

**Table 3. Plant responses to inoculation of common bean and *Lotus burtii* with *R. tropici* CIAT 899 and derivative strains.** <sup>a</sup>Data represent means ± S.D. of six plant jars. Each jar contained two plants. *P. vulgaris* plants were evaluated 30 days after inoculation. *Lotus burtii* plants were evaluated 45 days after inoculation. <sup>b</sup>Data obtained from del Cerro *et al.*<sup>22</sup>. The CIAT 899 derivatives and no inoculated parameters were individually compared with the parental strain by using the Mann-Whitney non-parametric test. Values tagged by asterisk (\*) are significantly different ( $\alpha = 5\%$ ).

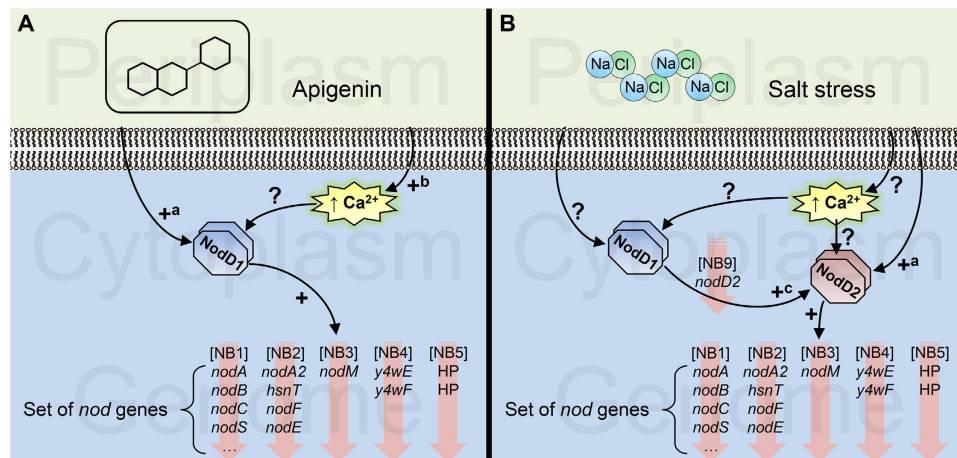
implied in the biosynthesis of the bacterial Nodulation Factors (NF)<sup>5–11</sup>. This is an especial feature of rhizobia, since flavonoids have also been described as antimicrobial compounds for many bacteria, including plant pathogens<sup>1,2</sup>. Thus, rhizobia seem to redirect the stress caused by these phenylpropanoid compounds towards a beneficial relationship that culminates in the formation of the nodule.

One of the most important symbionts of *P. vulgaris* is *R. tropici* CIAT 899<sup>18,19</sup>. This strain tolerates several environmental stresses and is characterized by its ability to produce a large variety of NF<sup>24</sup>, which are synthesized even in the absence of inducer flavonoids and in a NodD1-independent manner if bacteria are grown under salt stress conditions<sup>27</sup>. Recent transcriptomic data indicate that this bacterium shows similarities in its transcriptional activation patterns in the presence of both inducers not only for the *nod* genes, but also for other important symbiotic genes, suggesting a strategy to overcome salt stress conditions towards symbiosis<sup>28</sup>. In our study we have determined that NodD2 is the transcriptional regulator responsible of the up-regulation of these symbiotic genes under salt stress.

First, we demonstrated that NodD2 is responsible for the transcriptional activation of the *nodA* gene in the presence of high concentrations of salt. This result correlates with the abolishment of the NF production under this inducing condition (Fig. 1). This finding is not enough to ensure the role of NodD2 in the activation of the CIAT 899 symbiotic genes, since at least 17 genes, controlled by 5 different NBs, are up-regulated in the presence of both inducing molecules<sup>28</sup>. Although not all genes are fully characterized, it is well known that many of them are involved in NF production (*nodA1BCSUIJH*, *nodA2hsnTnodFE* and *nodM* genes) or in the synthesis of the phytohormone indole-3-acetic acid (*y4wEF* genes). For this reason, the RNA-seq study was decisive to ascertain the main role of NodD2 in the promotion of symbiosis under salt stress conditions (Fig. 2) (Table 1) (Supplementary Files 3–5). Thus, two initially unfavorable conditions are activating the same symbiotic machinery in CIAT 899, maybe in a strategy to overcome both bacterial stresses by means of the establishment of a symbiotic association. Besides, it is possible that this strategy is not exclusive of salt stress conditions, since other environmental stresses such as acidity or osmotic pressure (high concentration of mannitol) also induce the *nodA1BC* operon in CIAT 899 (our unpublished data). Interestingly, other bacterial stressing compounds such as trigonelline and stachydrine, two alkaloids released by alfalfa seeds, also activate the NodD2 protein of *Sinorhizobium meliloti*<sup>29</sup>. Further experiments will be required to elucidate whether several events in the rhizosphere, such as a high osmotic pressure, are inducing the symbiotic genes at the same level of a plant-released flavonoid.

Finally, transcriptomic analyses indicated that despite the fact that NodD1 is not involved in the up-regulation of symbiotic genes under salt stress, there is one gene up-regulated via NodD1 and salt and located downstream of a NB, the *nodD2* gene. This finding indicates that NodD1 could be increasing *nodD2* expression to enhance the concentration of NodD2 and consequently the production of NF in the presence of high concentrations of salt (Fig. 3). However, how salt is activating NodD2 is uncertain. It has been reported that in *R. leguminosarum* transient increases of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> are generated in the presence of flavonoids<sup>16</sup>. Thus, it would be possible that environmental stresses could also be generating a transient intracellular Ca<sup>2+</sup> increase or activating other unknown regulatory elements, that would activate the symbiotic machinery generating also certain activation of NodD1, which would bind to the NB located upstream of the *nodD2* gene, increasing the concentration of NodD2.

The link between NodD1 and NodD2 was also confirmed in assays of biological activity and nodulation tests, since both transcriptional regulators are crucial for the production of symbiotic NF in CIAT 899, which is directly related with the ability of this bacterium to nodulate with *P. vulgaris* and *L. burtii* (Tables 2 and 3). Here we reported the *in vivo* role of NodD2 since it is necessary the absence of both NodD1 and NodD2 to abolish the nodulation processes in these legumes. These results indicated that NodD2 had a biological role in the induction of the nodulation genes independently of the classic activation of these genes in the presence of the corresponding flavonoids. However, the concentration of salt employed in this work (300 mM) in the *in vitro* experiments cannot be used in the nodulation assays because legumes used in this work cannot grow in salt concentrations higher than 25 mM (our unpublished data). Thus, further experiments will determine which biological condition/s in the rhizosphere is inducing the activation of the *nod* genes through NodD2.



**Figure 3.** Proposed model to explain the regulation of the expression of the *nod* genes under apigenin (A) and salt stress (B) conditions in *Rhizobium tropici* CIAT 899. In the presence of high concentration of salt, NodD1 binds to NB9 increasing the expression of *nodD2*. (+) Indicates confirmed up-regulation, (+<sup>a</sup>) indicates that flavonoids or salt activate NodD1 and NodD2, respectively, whereas other factors may also be involved in the activation, (+<sup>b</sup>) indicates up-regulation confirmed in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, (+<sup>c</sup>) indicates putative up-regulation according to our transcriptomic CIAT 899 data, where in the presence of high concentration of salt, NodD1 binds to NB9 increasing the expression of *nodD2* expression. Finally, (?) indicates hypothetical up-regulation.

In conclusion, this is the first time in which it is demonstrated that a NodD protein is directly implied in the transcriptional activation of all symbiotic genes and in the synthesis of NF under an abiotic stress condition. Absence of NodD2 but not of NodD1 results in an absence of NF under saline conditions. However, we have observed in the RNAseq analyses that the nodulation genes induced in saline conditions in the wild-type strain CIAT 899 were induced to a higher rate than the corresponding genes induced in the *nodD1* mutant. These results could indicate that NodD1 could somehow be involved in the activation of the NF synthesis under saline conditions. In these conditions, NodD2 activates the transcription of the *nod* genes, and we cannot discard that NodD2 also activate the *nodD1* gene, and NodD1 in turn, activate the expression of the *nod* genes. Thus, the mechanism by which salt is directly or indirectly promoting the activation of NodD2 remains unclear. Future efforts should be focused in the molecular understanding of this special response of CIAT 899 under salt stress conditions.

## Material and methods

**Bacteria growth conditions, plasmids, mutant obtaining.** All strains and plasmids used in this work are listed in Table S1. *R. tropici* CIAT 899 strains were grown at 28 °C on tryptone yeast (TY) medium<sup>30</sup>, B- minimal medium<sup>31</sup> or yeast extract mannitol (YM) medium<sup>32</sup>, supplemented when necessary with apigenin 3.7 μM or with NaCl 300 mM. *Escherichia coli* strains were cultured on LB medium<sup>33</sup> at 37 °C. When required, the media were supplemented with the appropriate antibiotics as previously described<sup>34</sup>. The  $\Delta nodD2$  and the double  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$  deletion mutants were made by overlapping PCR extension as previously described<sup>35</sup>, where 819 pb and 885 pb length were deleted from *nodD1* and *nodD2*, respectively. The deleted DNA fragments were firstly cloned in the pK18mobsacB vector obtaining plasmids pMUS1397 and pMUS1395, respectively. Then, plasmids were transferred by conjugation and integrated in the genome of CIAT 899 by single recombination. Finally, a homologue recombination event in which the wild-type copy of the gene together with plasmid pK18mobsacB were lost, was selected. Mutated strains were confirmed by PCR and DNA-DNA hybridization. Moreover, both *nodD2* mutant strains were complemented: plasmid pBBR1-MCS-5 containing the wild-type *nodD2* gene (pMUS1396) was transferred to the *nodD2::Ω* mutant strain generating the *in trans* complemented strain *nodD2::Ω* (pMUS1396). The  $\Delta nodD2$  mutant was complemented *in cis* by integration of plasmid pK18mobsacB containing the *nodD2* wild-type copy (pMUS1395) in the genome, obtaining the  $\Delta nodD2$  (pMUS1395) strain. Besides, the *nodD1* mutant (RSP82 strain) was also complemented *in trans* with plasmid pBBR1-MCS-5 containing the wild-type *nodD1* gene (pMUS1398). Finally, the double  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$  deletion mutant was also complemented separately with a copy of the *nodD1* and *nodD2* wild-type gene. For that, plasmid pMUS1395 and the *nodD1* gene cloned into plasmid pK18mobsacB (pMUS1397) were integrated in the genome of the double mutant strain by conjugation and simple recombination, respectively, obtaining the  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$  (pMUS1397) and the  $\Delta nodD1/\Delta nodD2$  (pMUS1395) strains. Primers employed in this study are listed in Table S7.

The parental and derivative strains were deposited at the culture collection of the Department of Biology of the Universidad de Sevilla and at the Diazotrophic and Plant Growth Promoting Bacteria Culture Collection of Embrapa Soja (WFCC Collection #1213, WDCM Collection #1054).

**Determination of  $\beta$ -galactosidase activity.** To determinate the  $\beta$ -galactosidase activity, wild-type, mutant and complemented strains were conjugated with the plasmid pMP240 which contains the transcriptional fusion between the *R. leguminosarum* bv. *viciae* *nodA* promoter and the *lacZ* gene (Table S1)<sup>36</sup>. Assays of  $\beta$ -galactosidase



activity from CIAT 899 and derivative strains were carried out as described by Zaat *et al.*<sup>37</sup>. Units of  $\beta$ -galactosidase activity were calculated according to Miller<sup>38</sup>. The experiments were repeated three times, with six replicates each time.

**RP-TLC analysis of NF.** Reversed-phase thin layer chromatography analyses were performed according to Spaink *et al.*<sup>31</sup>. Briefly, *R. tropici* CIAT 899 was grown on B<sup>-</sup> minimal medium, supplemented when necessary with inducing molecules. For the radiolabeling of Nod factors, 0.2  $\mu$ Ci of N-acetyl-D-[1-<sup>14</sup>C]-glucosamine (specific activity 0.05 mCi) (PerkinElmer) was used. Cultures of 1 mL were grown to the end of the exponential growth phase and the supernatant was extracted with water-saturated butanol. The butanol fraction was evaporated to dryness and the resulting powder dissolved in 40  $\mu$ L of water-saturated butanol. This solution (10  $\mu$ L) was applied to the TLC plate (RP-18F254S) (Merck), where the Nod factors were separated with 50% acetonitrile/H<sub>2</sub>O (vol/vol) as the mobile phase. TLC plates were exposed to a Fuji BAS-III film for 10 days and the image was digitalized using the Phosphor-image system (Fuji).

**Identification of NF and biological activity assays.** NF purification and LC-MS/MS analyses were performed as previously described<sup>21,22</sup> by growing the wild-type and the derivative mutant strains in B<sup>-</sup> minimal medium, supplemented when required with NaCl 300 mM or apigenin 3.7  $\mu$ M.

The purified NF were used for biological activity assays. Thus, common bean seeds were surface-sterilized and mounted in test tubes on a curled wire with the roots in 25 mL of Farhaeus medium<sup>39</sup>. Roots were shielded from light, and plants were grown for 10 days. Chamber conditions were 16 h at 26 °C in the light and 8 h and 18 °C in the dark, with 70% of humidity. To determine the presence of pseudonodules, roots were cleared with sodium hypochlorite and stained with methylene blue using the method of Truchet *et al.*<sup>40</sup>. Each experiment was repeated three times with six plants for each treatment.

**Nodulation assays.** For the evaluation of the symbiotic phenotypes, the wild-type, the mutants and the complemented strains were grown in YM medium until the concentration of 10<sup>9</sup> cells mL<sup>-1</sup>. Surface-sterilized seeds of *P. vulgaris* and *L. burtii* were pre-germinated and placed on sterilized Leonard jars and test tubes respectively, containing Farhaeus N-free solution<sup>39</sup>. Germinated seeds were then inoculated with 1 mL of bacterial culture. Growth conditions were 16 h at 26 °C in the light and 8 h and 18 °C in the dark, with 70% of humidity. Nodulation parameters were evaluated after 30 days for *P. vulgaris* or 45 days for *L. burtii*. Shoots were dried at 70 °C for 48 h and weighed. Nodulation experiments were performed three times.

**RNA extraction.** Total RNA was isolated using a High Pure RNA Isolation Kit (Roche), according to the manufacturer's instructions. Verification of the amount and quality of total RNA samples was carried out using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and a Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen). Two independent total RNA extractions were obtained for each condition.

**Quantitative reverse transcription PCR.** Results obtained in the RNA-seq analysis were validated by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) of 13 selected nodulation genes which represented differentially and non-differentially expressed genes in the presence of apigenin and salt. Total RNA was isolated using a High Pure RNA Isolation Kit (Roche) and RNAase Free DNA Set (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. This (DNA-free) RNA was reverse transcribed into cDNA using a QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Quantitative PCR was performed using a LightCycler 480 (Roche) with the following conditions: 95 °C, 10 min; 95 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; 72 °C, 20 s; forty cycles, followed by the melting curve profile from 60 to 95 °C to verify the specificity of the reaction. The *R. tropici* CIAT 899 16S rRNA gene was used as an internal control to normalize gene expression. The fold-changes of two biological samples with three technical replicates of each condition were obtained using the  $\Delta\Delta$ Ct method<sup>41</sup>. Selected genes and primers are listed in S5.

**RNA sequencing.** Ribosomal RNA was depleted using a MICROB Express Bacterial mRNA Purification kit (Ambion), following the manufacturer's protocol. Integrity and quality of the ribosomal depleted RNA was checked with Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). RNA sequencing was carried out by Sistemas Genómicos ([https://www.sistemasgenomicos.com/web\\_sg/](https://www.sistemasgenomicos.com/web_sg/)) with the Next Generation Sequence (NGS) platform Illumina using the Illumina HiSeq 2000 sequencing instrument (Illumina). Ribosomal-depleted samples were used to generate whole transcriptome libraries following the manufacturer's recommendations for sequencing on this NGS platform. Amplified cDNA quality was analyzed by the Bioanalyzer 2100 DNA 1000 kit (Agilent Technologies) and quantified using the Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen). The RNA-seq data discussed in this work have been deposited in the Sequence Read Archive of NCBI under the accession number PRJNA326592.

**Mapping of the RNA-seq data.** The initial whole transcriptome paired-end reads obtained from sequencing were mapped against the latest version of the *R. tropici* CIAT 899 genome ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Rhizobium\\_tropici\\_CIAT\\_899](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Rhizobium_tropici_CIAT_899)) using the Life Technologies mapping algorithm version 1.3 (<http://www.lifetechnologies.com/>). Low-quality reads were eliminated using Picard Tools software version 1.83, remaining only high quality reads.

**Assessment of differentially expressed genes.** Gene prediction was estimated using the cufflinks method<sup>42</sup> and the expression levels were calculated using the htseq software, version 0.5.4p3<sup>43</sup>. This method eliminates multimapped reads, considering only unique reads for the gene expression estimation. The edge method version 3.2.4 was applied for differential expression analysis among conditions<sup>44</sup>. This method uses a Poisson model to estimate the variance of the RNA-seq data for differential expressions, and relies on different normalized processes based on depth global samples, CG composition and length of genes. Differentially expressed genes were established in those genes with a fold-change lower or higher than -3 or 3, respectively, with a *p* value adjust to 0.15<sup>45,46</sup>.

## References

- Hassan, S. & Mathesius, U. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *J Exp Bot.* **63**, 3429–3444 (2012).
- Makoi, J. H. J. R. & Ndakidemi, P. A. Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. *African Journal of Biotechnology*. **6**, 1358–1368 (2007).
- Cooper, J. E. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol.* **103**, 1355–1365 (2007).
- Oldroyd, G. E. Speak, friend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol.* **11**, 252–263 (2013).
- Hungria, M., Johnston, A. W. B. & Phillips, D. A. Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris*) on *nodD*-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. *Mol Plant Microbe Interact.* **5**, 199–203 (1992).
- Hungria, M. & Phillips, D. A. Effects of a seed color mutation on rhizobial *nod*-gene-inducing flavonoids and nodulation in common bean. *Mol Plant Microbe Interact.* **6**, 418–422 (1993).
- Schlaman, H. R. M., Phillips, D. A. & Kondorosi, E. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. In Spaink, H. P., Kondorosi, A., Hooykaas, P. J. J. editors. *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers. pp. 361–386 (1998).
- Long, S. R. SnapShot: Signaling in Symbiosis. *Cell*. **167**, 582–582 (2016).
- Peck, M. C., Fisher, R. F. & Long, S. R. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* **188**, 5417–5427 (2006).
- Peck, M. C., Fisher, R. F., Bliss, R. & Long, S. R. Isolation and characterization of mutant *Sinorhizobium meliloti* NodD1 proteins with altered responses to luteolin. *J Bacteriol.* **195**, 3714–3723 (2013).
- Dénarié, J., Debelle, F. & Prome, J. C. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem.* **65**, 503–535 (1996).
- del Cerro, P. *et al.* NrcR, a New Transcriptional Regulator of *Rhizobium tropici* CIAT 899 Involved in the Legume Root-Nodule Symbiosis. *PLoS one*. **11**, e0154029; doi: 10.1371/journal.pone.0154029 (2016).
- Barnett, M. J. & Long, S. R. The *Sinorhizobium meliloti* SyrM regulon: effects on global gene expression are mediated by *syrA* and *nodD3*. *J bacteriol.* **197**(10), 1792–1806 (2015).
- Cren, M., Kondorosi, A. & Kondorosi, E. NodR controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factor synthesis. *Mol Microbiol.* **15**, 733–747 (1995).
- Vinardell, J. M. *et al.* NodR regulates diverse symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. *Mol Plant Microbe Interact.* **17**, 676–685 (2004).
- Moscatiello, R., Squartini, A., Mariani, P. & Navazio, L. Flavonoid-induced calcium signalling in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. *New Phytol.* **188**(3), 814–823 (2010).
- Leganes, F., Forchhammer, K. & Fernandez-Pinas, F. Role of calcium in acclimation of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 to nitrogen starvation. *Microbiology*. **155**, 25–34 (2009).
- Hungria, M. *et al.* Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol Biochem.* **21**, 1515–1528 (2000).
- Martínez-Romero, E. *et al.* *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J Syst Bacteriol.* **41**, 417–426 (1991).
- Ormeño-Orrillo, E. *et al.* Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics* **13**, 735; doi: 10.1186/1471-2164-13-735 (2012).
- del Cerro, P. *et al.* Regulatory *nodD1* and *nodD2* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 and their roles in the early stages of molecular signaling and host-legume nodulation. *BMC Genomics*. **16**, 251; doi: 10.1186/s12864-015-1458-8 (2015).
- del Cerro, P. *et al.* Opening the “black box” of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899. *BMC Genomics*. **16**, 864; doi: 10.1186/s12864-015-2033-z (2015).
- Nogales, J. *et al.* *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Mol plant microbe interact.* **15**, 225–232 (2002).
- Poupot, R., Martínez-Romero, E. & Promé, J. C. Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing an *N*-methyl-*N*-acetylglucosaminyl terminus. *Biochemistry*. **32**, 10430–10435 (1993).
- Morón, B. *et al.* Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. *Chem Biol.* **12**, 1029–1040 (2005).
- Estévez, J. *et al.* Different and new Nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899 following Na<sup>+</sup> stress. *FEMS Microbiol Lett.* **293**, 220–231 (2009).
- Guasch-Vidal, B. *et al.* High NaCl concentrations induce the *nod* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899 in the absence of flavonoid inducers. *Mol Plant Microbe Interact.* **26**, 451–460 (2013).
- Pérez-Montaño, F. *et al.* RNA-seq analysis of the *Rhizobium tropici* CIAT 899 transcriptome shows similarities in the activation patterns of symbiotic genes in the presence of apigenin and salt. *BMC Genomics* **17**, 198; doi: 10.1186/s12864-016-2543-3 (2016).
- Phillips, D. A., Joseph, C. M. & Maxwell, C. A. Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **99**, 1526–1531 (1992).
- Beringer, J. E. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol.* **84**, 188–198 (1974).
- Spaink, H. P. Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and questions. *Plant Mol Biol.* **20**, 977–986 (1992).
- Vincent, J. M. The modified Fåhræus slide technique. A manual for the practical study of root nodule bacteria, eds Vincent, J. M. 144–145 (Oxford, UK. Blackwell Scientific Publications, 1970).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. Molecular Cloning. *A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor NY USA, 1989).
- Lamrabet, Y. *et al.* Mutation in GDPfucose synthesis genes of *Sinorhizobium fredii* alters Nod factors and significantly decreases competitiveness to nodulate soybeans. *Mol Plant Microbe Interact.* **12**, 207–217 (1999).
- Griffitts, J. S. & Long, S. R. A symbiotic mutant of *Sinorhizobium meliloti* reveals a novel genetic pathway involving succinoglycan biosynthetic functions. *Mol Microbiol.* **67**, 1292–1306 (2008).
- de Maagd, R. A., Wijffelman, C. A., Pees, E. & Lugtenberg, B. J. J. Detection and subcellular localization of two Sym plasmid-dependent proteins of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *J Bacteriol.* **170**, 4424–4427 (1988).
- Zaat, S. A. *et al.* Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI by plant flavanones and flavones. *J Bacteriol.* **169**, 198–204 (1987).
- Miller, J. H. *Experiment in Molecular Genetics*. (Cold Spring Harbor NY USA, 1972).
- Farhaeus, G. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol.* **16**, 374–381 (1957).
- Truchet, G., Camut, S., de Billy, F., Odorico, R. & Vasse, J. The *Rhizobium*-legume symbiosis. Two methods to discriminate between nodules and other root derived structures. *Protoplasma*. **149**, 82–89 (1989).
- Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45; doi: 10.1093/nar/29.9.e45 (2001).
- Trapnell, C. *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol.* **28**, 511–515 (2010).

43. Anders, S. & Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**, R106 (2010).
44. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* **26**, 139–140 (2010).
45. Kovach, M. E. *et al.* Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene.* **166**, 175–176 (1995).
46. Schafer, A. *et al.* Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* **145**, 69–73 (1994).

## Acknowledgements

We would like to thank the Ministerio de Economía y Competitividad of the Spanish government (project AGL2016-77163-R), the Junta de Andalucía (project P11-CVI-7050) and the University of Seville (VPPI) for funding this work. Mr. Del Cerro is recipient of an FPU fellowship (FPU14/00160) of the Ministerio de Economía y Competitividad. Dr. Pérez-Montañó is recipient of a post-doctoral contract of the VPPI of the University of Seville. Dr. Hungria is a research fellow of CNPq-Brazil. We also would like to acknowledge Dr. Juan Carlos Treviño (Sistemas Genómicos S.L.) for his help during all the bioinformatic analysis and Dr. Jonathan Trow (Sequence Read Archive from NCBI) for his technical assistance during the RNA-seq data submission. We thank the Servicio General de Biología of the CITIUS from the University of Seville for allowing us to use their laboratory equipment.

## Author Contributions

Designed the experiments: F.J.O., M.M., M.H. Performed the experiments: P.d.C., F.P.M., F.J.L.B., A.G.S. Wrote the paper: F.J.O., P.d.C., F.P.M., M.H. Funding resources: F.J.O., F.J.L.B., A.G.S., M.M.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

**Competing Interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** del Cerro, P. *et al.* The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. *Sci. Rep.* **7**, 46712; doi: 10.1038/srep46712 (2017).

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

RESEARCH ARTICLE

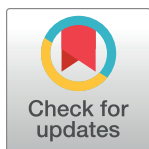
# Osmotic stress activates *nif* and *fix* genes and induces the *Rhizobium tropici* CIAT 899 Nod factor production via NodD2 by up-regulation of the *nodA2* operon and the *nodA3* gene

Pablo del Cerro<sup>1</sup>, Manuel Megías<sup>1</sup>, Francisco Javier López-Baena<sup>1</sup>, Antonio Gil-Serrano<sup>2</sup>, Francisco Pérez-Montaña<sup>1</sup>, Francisco Javier Ollero<sup>1</sup>\*

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain,

<sup>2</sup> Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

\* [fjom@us.es](mailto:fjom@us.es).



## OPEN ACCESS

**Citation:** del Cerro P, Megías M, López-Baena FJ, Gil-Serrano A, Pérez-Montaña F, Ollero FJ (2019) Osmotic stress activates *nif* and *fix* genes and induces the *Rhizobium tropici* CIAT 899 Nod factor production via NodD2 by up-regulation of the *nodA2* operon and the *nodA3* gene. PLoS ONE 14 (3): e0213298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213298>

**Editor:** Marie-Joelle Virolle, Université Paris-Sud, FRANCE

**Received:** November 7, 2018

**Accepted:** February 19, 2019

**Published:** March 27, 2019

**Copyright:** © 2019 del Cerro et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are included in the paper and its Supporting Information files, or are available in the NCBI repository. The RNA-seq data discussed in this work have been deposited in the Sequence Read Archive of NCBI under the accession numbers PRJNA470887, PRJNA326592 and PRJNA305690.

**Funding:** PdC, MM, AMGS, FJO were supported by Ministerio de Economía y Competitividad, grant

## Abstract

The symbiosis between rhizobia and legumes is characterized by a complex molecular dialogue in which the bacterial NodD protein plays a major role due to its capacity to activate the expression of the nodulation genes in the presence of appropriate flavonoids. These genes are involved in the synthesis of molecules, the nodulation factors (NF), responsible for launching the nodulation process. *Rhizobium tropici* CIAT 899, a rhizobial strain that nodulates *Phaseolus vulgaris*, is characterized by its tolerance to multiple environmental stresses such as high temperatures, acidity or elevated osmolarity. This strain produces nodulation factors under saline stress and the same set of CIAT 899 nodulation genes activated by inducing flavonoids are also up-regulated in a process controlled by the NodD2 protein. In this paper, we have studied the effect of osmotic stress (high mannitol concentrations) on the *R. tropici* CIAT 899 transcriptomic response. In the same manner as with saline stress, the osmotic stress mediated NF production and export was controlled directly by NodD2. In contrast to previous reports, the *nodA2FE* operon and the *nodA3* and *nodD1* genes were up-regulated with mannitol, which correlated with an increase in the production of biologically active NF. Interestingly, in these conditions, this regulatory protein controlled not only the expression of nodulation genes but also the expression of other genes involved in protein folding and synthesis, motility, synthesis of polysaccharides and, surprisingly, nitrogen fixation. Moreover, the non-metabolizable sugar dulcitol was also able to induce the NF production and the activation of *nod* genes in CIAT 899.

## Introduction

Legume plants can establish a symbiotic interaction with a group of soil bacteria, known as rhizobia, that fix atmospheric nitrogen in specialized root organs called nodules. This process requires a complex and evolved molecular dialogue between both organisms, which is initiated



reference: AGL2016-77163-R. <http://www.ciencia.gob.es/portal/site/MICINN/>. PdC was supported by Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, grant reference: FPU14-00160. <https://www.mecd.gob.es/portada-mecd/>. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

by the exudation of plant flavonoids [1]. These molecules are recognized by the NodD protein, a bacterial transcriptional regulator that binds to specific promoter sequences denominated *nod* boxes (NB), activating the expression of the nodulation (*nod*) genes. Proteins encoded by these genes are responsible for the synthesis and export of specific rhizobial lipochitooligosaccharides, also called Nod factors (NF) [2,3], whose recognition by the host plant triggers both rhizobial infection and initiation of nodule organogenesis [4]. Interestingly, in *Rhizobium tropici* CIAT 899 (hereafter CIAT 899), a broad host-range strain microsymbiont of *Phaseolus vulgaris* (common bean), the synthesis and export of NF is not only triggered by inducing flavonoids but also by acidity or high concentrations of salt [5–7]. The analysis of the CIAT 899 genome indicates that this bacterium harbours in the symbiotic plasmid three different *nodA* genes and five different *nodD* genes, which are responsible for the CIAT 899 capacity to produce a large variety of NF under different environmental conditions [8–11].

During their free-living stage in the soil, rhizobia are exposed to multiple physical stresses such as high temperatures, acidity or elevated osmolarity [12]. Interestingly, CIAT 899 is also characterized for tolerating all these stressing conditions [13]. Thereby, the CIAT 899 transcriptome in the presence of salt displays many differentially expressed genes involved in osmotic-stress tolerance and adaptation [14]. Besides, under these stressing conditions, the same set of CIAT 899 nodulation genes activated by inducing flavonoids (*nodA1BCSUIJH* [under the control of *nod* box1, NB1], *nodA2hsnTnodFE* [NB2], *nodM* [NB3], *y4wEF* [NB4] and two genes with unknown functions [NB5]) are also up-regulated, suggesting that synthesis and export of NF occurs in the same manner. However, the salt-mediated production of NF in this bacterium is induced by NodD2, whereas flavonoid-induced synthesis is controlled by NodD1 [14–17]. This peculiar production of symbiotic molecules seems to be a strategy of CIAT 899 to ensure nodulation under osmotic stressing conditions [14].

In this paper, we have studied the *R. tropici* CIAT 899 transcriptomic response to the presence of high concentrations of mannitol to establish the similarities and differences between salt- and mannitol-mediated transcriptomic responses. Besides to changes in the expression values of genes related to osmotic-stress tolerance and mannitol metabolism, RNA-seq experiments indicated that not only some *nod* genes were up-regulated in the presence of mannitol but also operons implied in nitrogen fixation. Moreover, other non-metabolizable sugar (dulcitol) also induce the NF production and *nod* genes activation in CIAT 899. Finally, we determined that the activation of nodulation genes correlated with the overproduction of NF, which directly depended on the NodD2 protein.

## Materials and methods

### Bacterial strains and plasmids

Strains used in this study were grown at 28°C on tryptone yeast (TY) medium (0 mM mannitol) for RNA-seq studies [18], B<sup>−</sup> minimal medium (55 mM mannitol) in NF-related experiments [19] or yeast extract mannitol (YM) medium (16,5 mM mannitol) in the  $\beta$ -galactosidase assays [20], supplemented with the appropriate mannitol concentrations when necessary. *Escherichia coli* strains were cultured on LB medium [21] at 37°C. When required, the media were supplemented with the appropriate antibiotics as previously described [22].

The growing curves were obtained with a Sinergy HT microplate reader (BioTek, USA) and growing the bacteria for 72 h at 28°C with continuous orbital shaking. Measurements were made every 4 h.

In this work the wild strain *R. tropici* CIAT 899 [15] and their *nodD* mutant derivative strains were used: *nodD1* mutant [7], *nodD2* mutant [10], *nodD3*, *nodD4*, and *nodD5* mutants [11]. Plasmid pMP240 [23], which contains a transcriptional fusion between the

*R. leguminosarum* biovar *viciae* *nodA* promoter and the *lacZ* gene, was transferred by conjugation to all these strains.

## RNA extraction and sequencing

*R. tropici* CIAT 899 and the  $\Delta nodD2$  mutant were grown on 7 ml of TY medium, supplemented with 400 mM mannitol when necessary. Bacteria were incubated at an orbital shaker (180 rpm) for 72 h at 28°C. To ensure aeration, the 7 ml of TY cultures were placed in 50 ml Falcon tubes. Total RNA was isolated using a High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Switzerland) according to the manufacturer's protocol. Verification of the amount and quality of total RNA samples was carried out using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) and a Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA). Two independent total RNA extractions were obtained for each condition and strain.

Ribosomal RNA was depleted using a MICROB Express Bacterial mRNA Purification kit (Ambion, USA), following the manufacturer's protocol. Integrity and quality of the ribosomal depleted RNA was checked with an Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA). RNA sequencing was carried out by Sistemas Genómicos ([https://www.sistemasgenomicos.com/web\\_sg/](https://www.sistemasgenomicos.com/web_sg/)) with the Next Generation Sequencing (NGS) platform Illumina with 100pb pair-end reads using the Illumina HiSeq 2000 sequencing instrument (Illumina, USA). Ribosomal-depleted samples were used to generate whole transcriptome libraries following the manufacturer's recommendations for sequencing on this NGS platform. Amplified cDNA quality was analyzed by the Bioanalyzer 2100 DNA 1000 kit (Agilent Technologies, USA) and quantified using the Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA). The RNA-seq data discussed in this work have been deposited in the Sequence Read Archive of NCBI under the accession numbers PRJNA470887, PRJNA326592 [17] and PRJNA305690 [14].

A total of 8 RNA-seq libraries corresponding to the wild-type and the *nodD2* mutant strain, both under control and mannitol 400 mM conditions were generated (two independent biological experiments for each condition). Quality control of each run, sample normalizations and statistical procedures were performed as previously described [14] (S1 File). Differentially expressed genes for each strain and condition were obtained by comparing with gene expression levels of the wild-type strain grown under control conditions (S2 and S3 Files). Data set was validated by *q*RT-PCR as previously described [14], obtaining in all cases positive correlation degrees in fold-change values between the *q*RT-PCR and the RNA-seq data (Table 1, S4 File).

## RNA-seq data analysis

In the primary analysis, a quality control of the raw data was carried out by fastq. In the secondary analysis, the initial whole transcriptome paired-end reads obtained from sequencing were mapped against the latest version of the *R. tropici* CIAT 899 genome ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Rhizobium\\_tropici\\_CIAT\\_899](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Rhizobium_tropici_CIAT_899)) using the mapping algorithm Bowtie2 v2.3.1 [24]. Low-quality reads were eliminated using Samtools [25,26] and Picard Tools (<http://broadinstitute.github.io/picard/>), remaining only high-quality reads. The genetic quantification was calculated using the htseq\_count 0.6.1p1 method [27]. Gene differential expression and quantification were obtained by using DESeq2 [28]. In the tertiary analysis, the study of the concordance between the samples of the same conditions were made by a correlation study and Euclidean distance by using the statistic software R. To carry out the differential expression study among groups of samples Python and R software, and DESeq2 algorithm were used. Differentially expressed genes (DEG) in this study were established in those genes with a fold-change lower or higher than -2.5 or 2.5, respectively, with a *p* value adjusted to 0.05

**Table 1. RNA-Seq data validation using qRT-PCR.** Fold-change values were calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method and normalized to the reference gene 16S for 7 differentially expressed genes in the presence of mannitol 400 mM.

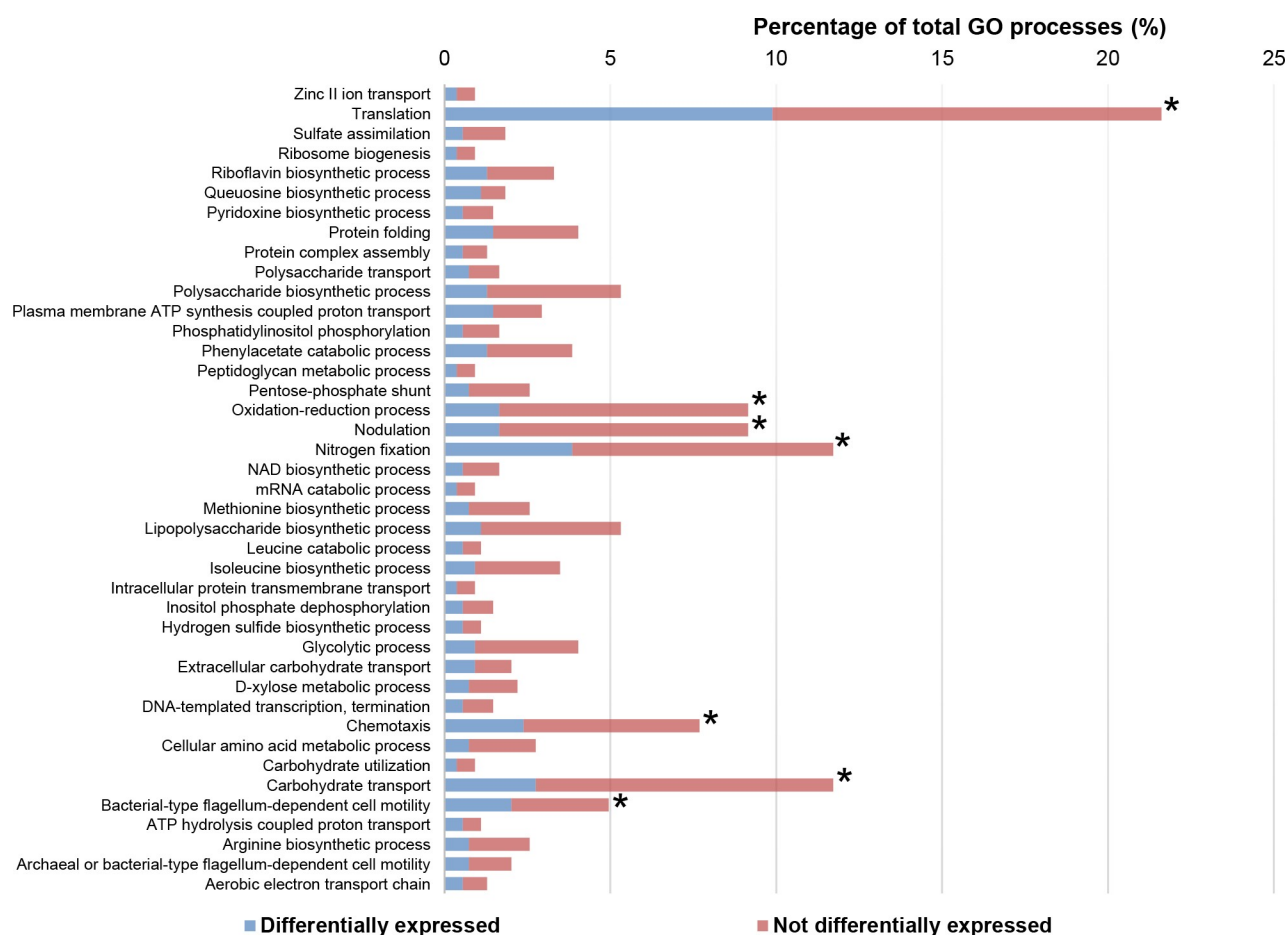
Gene name	ID / replicon	RNA-Seq		qRT-PCR	
		CIAT 899	<i>nodD2</i> mutant	CIAT 899	<i>nodD2</i> mutant
<i>mtlD</i>	YP_007335070.1 / chromosome	3.59	3.55	2.84±0.62	3.58±0.67
<i>mtlE</i>	YP_007335074.1 / chromosome	6.67	5.67	5.48±0.97	4.87±0.69
<i>fixC</i>	YP_007336103.1 / pRtrCIAT899b	5.65	5.42	3.86±0.21	7.26±1.23
<i>nodA2</i>	YP_007336039.1 / pRtrCIAT899b	2.57	1.57	2.78±0.33	1.16±0.16
<i>nodA3</i>	YP_007335966.1 / pRtrCIAT899b	3.59	2.13	3.04±0.86	2.07±0.24
<i>nodF</i>	YP_007335966.1 / pRtrCIAT899b	3.49	2.58	4.67±1.01	2.27±0.43
<i>nifH</i>	YP_007336128.1 / pRtrCIAT899b	11.90	9.06	12.25±2.43	8.66±1.86

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213298.t001>

by FDR [29]. Only the genes differentially expressed were considered for the biological processes represented from the Gene Ontology database (Fig 1).

## Quantification of nitrogenase activity

One colony of *R. tropici* CIAT 899 was grown for 72 h at 28°C in NFb [30] soft agar (0.4% agar) to simulate microaerobiosis conditions supplemented or not with 400 mM mannitol or



**Fig 1. Percentage of genes from each Gene Ontology category differentially expressed with 400 mM mannitol.** The percentage of genes shown corresponds to those genes present in the Gene Ontology database. Asterisks (\*) indicate those categories with higher percentages.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213298.g001>

dulcitol. After the incubation period, nitrogenase activity was quantified by acetylene reduction assays (ARA) as previously described [31]. *Azospirillum brasilense* Abv6 that also grows in 400 mM of mannitol, was used as positive control for ARA [32].

### Determination of the non-metabolizable sugar and culture media

The capacity of *R. tropici* CIAT 899 to use carbohydrates was studied by means of the API 50CH system (Biomérieux, France) according to the manufacturer's instructions. YM and B<sup>-</sup> media were used for  $\beta$ -galactosidase assays and Nod factor determination, respectively, in the presence of high concentrations of the non-metabolizable sugar. The YM and B<sup>-</sup> media contained 16.5 mM and 55 mM of mannitol, respectively, sugar concentrations that ensure bacterial growth. The non-metabolizable sugar was added to culture media at the appropriated concentration.

### $\beta$ -galactosidase assay

$\beta$ -galactosidase activity assays with strains harbouring plasmid pMP240 were carried out as previously described [33] by using YM medium. Units of  $\beta$ -galactosidase activity were calculated according to Miller [34]. The experiments were repeated three times, with six replicates each time.

### RP-TLC analysis of NF and biological activity determination

Reversed-phase thin layer chromatography (RP-TLC) analyses were performed as previously described [19]. *R. tropici* CIAT 899 was grown on B<sup>-</sup> minimal medium, supplemented when necessary with inducing molecules. For the NF radiolabeling, 0.2  $\mu$ Ci of N-acetyl-D-[1-<sup>14</sup>C]-glucosamine (specific activity 0.05 mCi) (Perkin Elmer) was used. Cultures of 1 mL were grown to the end of the exponential growth phase and the supernatant was extracted with water-saturated butanol. The butanol fraction was evaporated to dryness and the resulting powder dissolved in 40  $\mu$ L of water-saturated butanol. This solution (10  $\mu$ L) was applied to the TLC plate (RP-18F254S) (Merck, Germany), where the Nod factors were separated with 50% acetonitrile/H<sub>2</sub>O (vol/vol) as the mobile phase. TLC plates were exposed to a Fuji BAS-IIIIs film for 10 days and the image was digitalized using the Phosphor-image system (Fujifilm, Japan).

NF were purified from 1 L of culture for each sample following the procedure previously described [35]. Purified NF were resuspended in 50 ml of acetonitrile 20% and 1  $\mu$ L per mL of plant nutrient solution was added for biological activity assays. Thus, *P. vulgaris* Blue Bush Lake seeds were surface-sterilized and mounted in test tubes on a curled wire with the roots in 25 mL of Farhaeus medium [36]. Roots were protected from light and plants were grown for 10 days. Growth chamber conditions were 16 h at 26°C in the light and 8 h and 18°C in the dark, with 70% of humidity. To determine the presence of nodule primordia, roots were cleared with sodium hypochlorite and stained with methylene blue using the method of Truchet et al., 1989 [37]. Each experiment was repeated three times with six plants for each treatment.

### Nod factor determination by UHPLC-MS/MS

NF were purified as described above. Then, NF were analyzed with an Ultra High Pressure Liquid Chromatography (UHPLC) system consisting of a quaternary UHPLC Dionex Ultimate 3000 SD connected to a quadrupole-orbitrap Qexactive hybrid mass spectrometer (MS) (ThermoFisher Scientific, USA) with HESI ionization probe. Xcalibur software was used for

instrument control and data acquisition. Separation was carried out using a Tracer Excel 120 ODSB C18 column (2.1 x 200 mm, 5  $\mu$ m) (Teknokroma, Spain) at a flow rate of 0.3 ml/min. A binary gradient consisting of (A) water and (B) acetonitrile, both containing 0.1% formic acid, was used with the following elution profile: 50% B (5 min), linear gradient to 100% B (30 min), 100% B (2 min), linear up to 50% B (3 min) and finally 50% B (5 min). The injection volume was 20  $\mu$ L. A Data Dependent Acquisition method (TOP5) was used in positive mode at resolution 70000 and 17500 at  $m/z$  200 FWHM for Full Scan and Product Ion Scan, respectively. HESI source parameters were: spray voltage, 3.5 kV; S lens level, 50; capillary temperature, 320°C; sheath, auxiliary and sweep gas flow, 48, 11 and 2 respectively (arbitrary units); and probe heater temperature, 413°C. For data treatment, TraceFinder 3.3 software was used. The identification was made by comparing (maximum deviation of 5 ppm) the exact masses of the pseudomolecular ion and their fragment ions with the data contained in a LCO database with 1114 possible compounds. Isotopic pattern scores higher than 80% were also required.

## Results

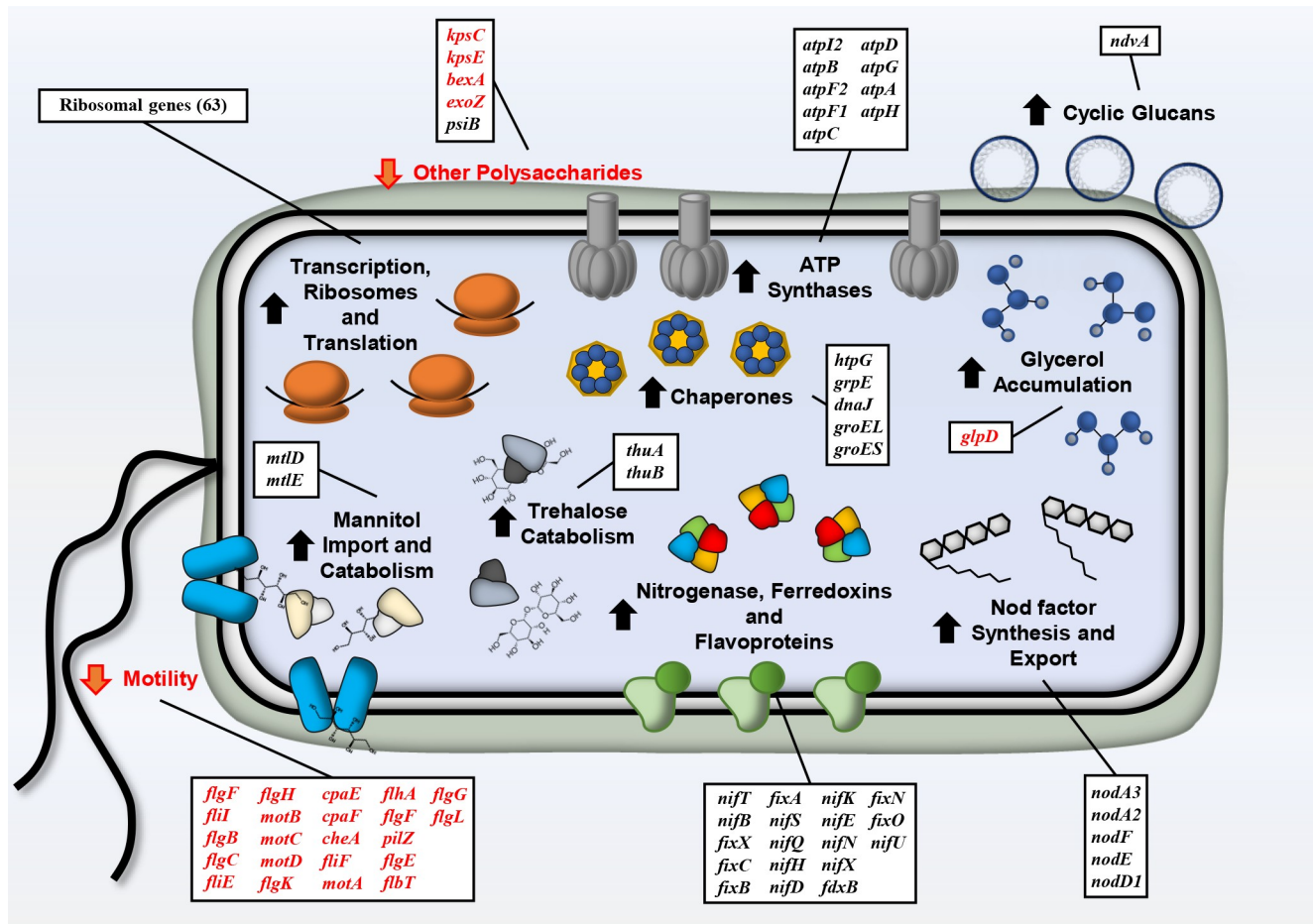
### Differentially expressed genes and biological processes altered in the presence of mannitol

The most surprising trait of CIAT 899 relies on its ability to produce biologically active NF under salt-stressing conditions in a flavonoid-independent manner via NodD2 [7,17]. However, the question is whether NF production is induced only in the presence of salt, which generates both ionic and osmotic stresses, or whether it is also induced in the presence of other osmotic stresses such as high mannitol concentration. To shed light to these questions, we have analyzed the effect of high concentrations of mannitol on CIAT 899. First, to establish the appropriate concentration of solute, the growing curves of CIAT 899 in mannitol increasing conditions were obtained (TY medium supplemented with 0 mM to 1000 mM of mannitol). Concentrations higher than 500 mM of mannitol severely decreased bacterial growth-rate, whilst concentrations between 100 and 400 mM did not significantly affect growth (S5 File). For this reason, we established 400 mM of mannitol as the osmotic-stressing condition for further studies.

To study the effect of mannitol on the global gene expression of CIAT 899, transcriptomic assays were carried out. Thus, four RNA-seq libraries corresponding to CIAT 899 grown under control (TY medium) or mannitol 400 mM conditions were constructed. Two independent biological experiments were performed for each condition, being the general features of each run displayed in S1 File. Differentially expressed genes (DEG) in each condition are shown in S2 and S3 Files. Data set was validated by qRT-PCR experiments (Table 1, S4 File).

The *R. tropici* CIAT 899 genome harbours 6289 genes distributed among one chromosome (3672 CDS, CP004015.1) and three plasmids: pRtrCIAT899a/pA (212 CDS, CP004016.1), pRtrCIAT899b/pB/symbiotic plasmid (500 CDS, CP004017.1), and pRtrCIAT899c/pC (1905CDS, CP004018.1). The transcriptomic analysis showed a total of 743 DEG whose expression was activated or repressed 2.5-fold in the presence of 400 mM of mannitol (S2 File). Most of these genes were up-regulated (461 DEG, 62%). The replicon distribution revealed that most of these genes (468 DEG; 333 up-regulated and 135 down-regulated) were located in the chromosome, some of them in plasmid B (67 DEG; 66 up-regulated and 1 down-regulated) and the rest in plasmid C (36 DEG; 19 up-regulated and 17 down-regulated) (S6 File). Finally, to determine those functions activated or repressed by mannitol, a functional enrichment was performed to establish the significant over-represented biological processes using data available at the Uniprot database (Gene Ontology, GO). In the presence of mannitol, the biological processes statistically affected in CIAT 899 were translation, chemotaxis,





**Fig 2. Genes and processes differentially regulated with 400 mM mannitol in *R. tropici* CIAT 899.** Red labelled and black labelled gene names and arrows indicate down-regulation and up-regulation, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213298.g002>

carbohydrate transport, oxidation-reduction processes and, interestingly, nodulation and nitrogen fixation (Fig 1).

## High concentrations of mannitol activate both osmotic-stress tolerance and symbiotic genes

Regarding to DEG (Fig 2, Table 2), up to 64 genes coding for RNA polymerases (*rpo* genes), some components of the ribosomes (*rps*, *rpl* and *rpm* clusters), translation elongation factors (*fus*, *tuf*, *tsf* and *efp* genes) and 9 genes implied in the synthesis of ATP synthetase subunits (*atp* cluster) were up-regulated, indicating that CIAT 899 is activating the general pathways for protein synthesis and energy generation to overcome the osmotic stress. Interestingly, several genes coding for chaperones (*htpG*, *grpE*, *dnaJ*, *groEL* and *groES*) were highly activated under mannitol conditions, indicating that CIAT 899 is ensuring the suitable protein folding under this abiotic-stressing condition. As expected, several genes that encode proteins related to mannitol import and catabolism were activated in this condition (*mtl* genes). Furthermore, transcriptomic data indicated that CIAT 899 could be accumulating compatible osmolytes, since the *glpD* gene, which is responsible for glycerol degradation, was repressed in the

Table 2. Fold-change values of relevant genes from *Rhizobium tropici* CIAT 899 and its *nodD2* mutant derivative grown with 400 mM mannitol.

ID / Replicon	Gene name	Function	Biological Role	Fold-change wild-type <sup>a</sup>	Fold-change <i>nodD2</i> mutant <sup>a</sup>
YP_007335070.1 / Chromosome	<i>mtlD</i>	Mannitol 2-dehydrogenase	Mannitol catabolism	3.59	3.56
YP_007335071.1 / Chromosome	-	Sorbitol/mannitol ABC transporter, ATP-binding protein	Mannitol/Sorbitol importation	4.80	3.85
YP_007335074.1 / Chromosome	<i>mtlE</i>	Sorbitol/mannitol ABC transporter, substrate-binding protein	Mannitol/Sorbitol importation	6.67	5.68
YP_007335245.1 / Chromosome	<i>glpD</i>	Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Glycerol catabolism/osmolyte as compatible	-2.93	-3.7
YP_007335966.1 / pRtrCIAT899b	<i>nodA3</i>	Acyl transferase	Nod factor synthesis and nodulation	3.59	NDEG
YP_007336039.1 / pRtrCIAT899b	<i>nodA2</i>	Acyl transferase	Nod factor synthesis and nodulation	2.57	NDEG
YP_007336041.1 / pRtrCIAT899b	<i>nodF</i>	Acyl carrier protein	Nod factor synthesis and nodulation	3.49	NDEG
YP_007336042.1 / pRtrCIAT899b	<i>nodE</i>	$\beta$ -ketoacyl synthase	Nod factor synthesis and nodulation	2.72	NDEG
YP_007336077.1 / pRtrCIAT899b	<i>nodD1</i>	Transcriptional regulator	Nod factor synthesis and nodulation	4.63	NDEG
YP_007336097.1 / pRtrCIAT899b	<i>nifT</i>	Nitrogen fixation protein	Nitrogen Fixation	5.04	NDEG
YP_007336100.1 / pRtrCIAT899b	<i>nifB</i>	Nitrogenase cofactor biosynthesis protein	Nitrogen Fixation	2.60	NDEG
YP_007336102.1 / pRtrCIAT899b	<i>fixX</i>	Ferredoxin protein	Nitrogen Fixation	4.26	3.52
YP_007336103.1 / pRtrCIAT899b	<i>fixC</i>	Electron transfer flavoprotein-quinone oxidoreductase	Nitrogen Fixation	5.65	5.42
YP_007336104.1 / pRtrCIAT899b	<i>fixB</i>	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	Nitrogen Fixation	5.91	5.34
YP_007336105.1 / pRtrCIAT899b	<i>fixA</i>	Electron transfer flavoprotein subunit beta	Nitrogen Fixation	3.68	3.75
YP_007336107.1 / pRtrCIAT899b	<i>nifS</i>	Cysteine desulfurase	Nitrogen Fixation	3.23	NDEG
YP_007336108.1 / pRtrCIAT899b	<i>nifU</i>	Fe-S cluster assembly protein	Nitrogen Fixation	3.62	NDEG
YP_007336110.1 / pRtrCIAT899b	<i>nifQ</i>	Nitrogen fixation protein	Nitrogen Fixation	3.92	4.02
YP_007336128.1 / pRtrCIAT899b	<i>nifH</i>	Nitrogenase iron protein	Nitrogen Fixation	11.90	9.07
YP_007336129.1 / pRtrCIAT899b	<i>nifD</i>	Nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	Nitrogen Fixation	14.00	10.77
YP_007336130.1 / pRtrCIAT899b	<i>nifK</i>	Nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain	Nitrogen Fixation	10.71	8.41
YP_007336131.1 / pRtrCIAT899b	<i>nifE</i>	Nitrogenase iron-molybdenum cofactor biosynthesis protein	Nitrogen Fixation	13.79	10.49
YP_007336132.1 / pRtrCIAT899b	<i>nifN</i>	Nitrogenase iron-molybdenum cofactor biosynthesis protein	Nitrogen Fixation	10.48	8.03
YP_007336133.1 / pRtrCIAT899b	<i>nifX</i>	Nitrogen fixation protein	Nitrogen Fixation	8.74	5.52
YP_007336134.1 / pRtrCIAT899b	-	Nitrogen fixation protein	Nitrogen Fixation	9.39	7.15
YP_007336136.1 / pRtrCIAT899b	<i>fdxB</i>	Ferredoxin-3	Nitrogen Fixation	8.75	NDEG
YP_007336050.1 / pRtrCIAT899b	<i>fixO</i>	cbb3-type cytochrome c oxidase subunit II	Nitrogen Fixation	7.55	NDEG

(Continued)

Table 2. (Continued)

ID / Replicon	Gene name	Function	Biological Role	Fold-change wild-type <sup>a</sup>	Fold-change <i>nodD2</i> mutant <sup>a</sup>
YP_007336049.1 / pRtrCIAT899b	<i>fixN</i>	cbb3-type cytochrome c oxidase subunit I	Nitrogen Fixation	6.13	NDEG
YP_007336979.1 / pRtrCIAT899c	<i>htpG</i>	Chaperone	Protein folding in response to stress	5.20	3.72
YP_007332415.1 / Chromosome	<i>grpE</i>	Chaperone	Protein folding in response to stress	4.67	NDEG
YP_007337672.1 / pRtrCIAT899c	<i>dnaJ</i>	Chaperone	Protein folding in response to stress	2.62	NDEG
YP_007332750.1 / Chromosome	<i>groEL</i>	Chaperone	Protein folding in response to stress	6.27	6.89
YP_007332751.1 / Chromosome	<i>groES</i>	Chaperone	Protein folding in response to stress	5.66	6.58
YP_007332230.1 / Chromosome	-	Flp/Fap type IV pilin	Motility	-3.44	-5.20
YP_007332235.1 / Chromosome	<i>cpaE</i>	Pilus assembly protein	Motility	-3.45	NDEG
YP_007332236.1 / Chromosome	<i>cpaF</i>	Pilus assembly protein	Motility	-3.69	-3.87
YP_007332594.1 / Chromosome		Methyl-accepting chemotaxis protein	Motility	-6.76	-8.65
YP_007332597.1 / Chromosome	<i>cheA</i>	Chemotaxis protein	Motility	-5.34	-4.44
YP_007332604.1 / Chromosome	<i>fliF</i>	Flagellar M-ring protein	Motility	-3.50	-4.26
YP_007332610.1 / Chromosome	-	Flagellar motor switch protein N	Motility	-3.70	NDEG
YP_007332612.1 / Chromosome	<i>motA</i>	Chemotaxis protein (motility protein A)	Motility	-3.41	-3.18
YP_007332613.1 / Chromosome	<i>flgF</i>	Flagellar basal-body rod protein	Motility	-10.03	-12.05
YP_007332614.1 / Chromosome	<i>fliI</i>	Flagellar protein export ATPase	Motility	-7.69	-4.29
YP_007332616.1 / Chromosome	<i>flgB</i>	Flagellar basal body rod protein	Motility	-11.29	-6.48
YP_007332617.1 / Chromosome	<i>flgC</i>	Flagellar basal-body rod protein	Motility	-9.00	-7.83
YP_007332618.1 / Chromosome	<i>fliE</i>	Flagellar hook-basal body complex protein	Motility	-6.19	NDEG
YP_007332619.1 / Chromosome	<i>flgG</i>	Flagellar basal-body rod protein	Motility	-5.35	-3.71
YP_007332623.1 / Chromosome	<i>flgH</i>	Flagellar L-ring protein	Motility	-4.69	NDEG
YP_007332627.1 / Chromosome	-	Putative flagellin protein	Motility	-11.23	-10.62
YP_007332628.1 / Chromosome	-	Putative flagellin protein	Motility	-6.50	-7.50
YP_007332634.1 / Chromosome	<i>motB</i>	Chemotaxis motility protein	Motility	-5.08	-5.55
YP_007332635.1 / Chromosome	<i>motC</i>	Chemotaxis motility protein	Motility	-6.18	NDEG
YP_007332636.1 / Chromosome	<i>motD</i>	Chemotaxis motility protein	Motility	-7.22	-6.91

(Continued)



Table 2. (Continued)

ID / Replicon	Gene name	Function	Biological Role	Fold-change wild-type <sup>a</sup>	Fold-change <i>nodD2</i> mutant <sup>a</sup>
YP_007332639.1 / Chromosome	<i>flgK</i>	Flagellar hook-associated protein	Motility	-7.10	-7.05
YP_007332640.1 / Chromosome	<i>flgL</i>	Flagellar hook-associated protein	Motility	-6.11	-5.43
YP_007332642.1 / Chromosome	<i>flbT</i>	FlagellarFlbT family protein	Motility	-5.36	NDEG
YP_007332645.1 / Chromosome	<i>flhA</i>	Flagellar biosynthesis protein	Motility	-3.53	-2.72
YP_007332822.1 / Chromosome	<i>flgF</i>	flagellar basal-body rod protein	Motility	-3.09	NDEG
YP_007332838.1/ Chromosome	-	Methyl-accepting chemotaxis protein	Motility	-3.61	NDEG
YP_007334811.1/ Chromosome	<i>pilZ</i>	Type IV pilus assembly protein	Motility	-6.14	NDEG
YP_007337874.1 pRtrCIAT899c	<i>flgE</i>	Flagellar hook protein FlgE	Motility	-4.28	-5.87
YP_007337988.1 pRtrCIAT899c	-	Methyl-accepting chemotaxis protein	Motility	-6.56	-3.83
YP_007333979.1 pRtrCIAT899c	-	Methyl-accepting chemotaxis protein	Motility	-2.74	-2.66
YP_007335234.1 Chromosome	-	Methyl accepting chemotaxis protein	Motility	-6.28	NDEG
YP_007332068.1 Chromosome	<i>rpsA</i>	30S ribosomal protein S1	Protein synthesis	3.23	NDEG
YP_007332085.1 Chromosome	<i>rpsO</i>	30S ribosomal protein S15	Protein synthesis	5.64	5.57
YP_007332296.1 Chromosome	<i>rpmI</i>	50S ribosomal protein L35	Protein synthesis	14.76	13.00
YP_007332297.1 Chromosome	<i>rplT</i>	50S ribosomal protein L20	Protein synthesis	9.46	8.66
YP_007332405.1 Chromosome	<i>rpsT</i>	30S ribosomal protein S20	Protein synthesis	11.17	12.68
YP_007333170.1 Chromosome	<i>rplI</i>	50S ribosomal protein L9	Protein synthesis	5.71	4.36
YP_007333172.1 Chromosome	<i>rpsR</i>	30S ribosomal protein S18	Protein synthesis	7.74	6.25
YP_007333173.1 Chromosome	<i>rpsF</i>	30S ribosomal protein S6	Protein synthesis	14.37	10.06
YP_007333286.1 Chromosome	<i>rpsI</i>	30S ribosomal protein S9	Protein synthesis	6.19	4.44
YP_007333287.1 Chromosome	<i>rplM</i>	50S ribosomal protein L13	Protein synthesis	5.62	4.45
YP_007333365.1 Chromosome	<i>rpmG</i>	50S ribosomal protein L33	Protein synthesis	4.40	3.86
YP_007333416.1 Chromosome	<i>rplK</i>	50S ribosomal protein L11	Protein synthesis	5.10	5.06
YP_007333417.1 Chromosome	<i>rplA</i>	50S ribosomal protein L 1	Protein synthesis	6.51	6.03
YP_007333418.1 Chromosome	<i>rplJ</i>	50S ribosomal protein L10	Protein synthesis	7.69	7.70
YP_007333419.1 Chromosome	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7/L 12	Protein synthesis	10.97	10.84

(Continued)

Table 2. (Continued)

ID / Replicon	Gene name	Function	Biological Role	Fold-change wild-type <sup>a</sup>	Fold-change <i>nodD2</i> mutant <sup>a</sup>
YP_007333423.1 Chromosome	<i>rpsL</i>	30S ribosomal protein S 12	Protein synthesis	21.82	18.09
YP_007333424.1 Chromosome	<i>rpsG</i>	30S ribosomal protein S7	Protein synthesis	16.69	12.51
YP_007333427.1 Chromosome	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10	Protein synthesis	15.07	12.92
YP_007333428.1 Chromosome	<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	Protein synthesis	13.92	11.65
YP_007333429.1 Chromosome	<i>rplD</i>	50S ribosomal protein L4/L1	Protein synthesis	18.07	14.96
YP_007333430.1 Chromosome	<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23	Protein synthesis	12.49	12.43
YP_007333431.1 Chromosome	<i>rplB</i>	50S ribosomal protein L23	Protein synthesis	12.19	10.22
YP_007333432.1 Chromosome	<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19	Protein synthesis	10.13	8.64
YP_007333433.1 Chromosome	<i>rplV</i>	50S ribosomal protein L23	Protein synthesis	11.44	10.90
YP_007333434.1 Chromosome	<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3	Protein synthesis	11.31	9.22
YP_007333435.1 Chromosome	<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	Protein synthesis	12.64	10.19
YP_007333436.1 Chromosome	<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29	Protein synthesis	10.08	8.88
YP_007333437.1 Chromosome	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17	Protein synthesis	9.15	8.18
YP_007333438.1 Chromosome	<i>rplN</i>	50S ribosomal protein L14	Protein synthesis	12.35	13.05
YP_007333439.1 Chromosome	<i>rplX</i>	50S ribosomal protein L24	Protein synthesis	13.22	11.73
YP_007333440.1 Chromosome	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	Protein synthesis	14.14	12.68
YP_007333441.1 Chromosome	<i>rpsN</i>	30S ribosomal protein S14	Protein synthesis	13.12	11.95
YP_007333442.1 Chromosome	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	Protein synthesis	11.76	11.02
YP_007333443.1 Chromosome	<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6	Protein synthesis	13.78	11.46
YP_007333444.1 Chromosome	<i>rplR</i>	50S ribosomal protein L18	Protein synthesis	12.44	11.99
YP_007333445.1 Chromosome	<i>rpsE</i>	30S ribosomal protein S5	Protein synthesis	16.91	15.70
YP_007333446.1 Chromosome	<i>rpmD</i>	50S ribosomal protein L30	Protein synthesis	6.89	7.33
YP_007333447.1 Chromosome	<i>rplO</i>	50S ribosomal protein L15	Protein synthesis	10.06	8.90
YP_007333450.1 Chromosome	<i>rpsM</i>	30S ribosomal protein S13	Protein synthesis	8.97	9.34
YP_007333451.1 Chromosome	<i>rpsK</i>	30S ribosomal protein S11	Protein synthesis	13.16	11.73
YP_007333453.1 Chromosome	<i>rplQ</i>	50S ribosomal protein L17	Protein synthesis	8.66	8.23

(Continued)

Table 2. (Continued)

ID / Replicon	Gene name	Function	Biological Role	Fold-change wild-type <sup>a</sup>	Fold-change <i>nodD2</i> mutant <sup>a</sup>
YP_007333632.1 Chromosome	<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	Protein synthesis	4.56	4.79
YP_007333904.1 Chromosome	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4	Protein synthesis	10.37	9.68
YP_007334465.1 Chromosome	<i>rplY</i>	50S ribosomal protein L25, Ctc-form	Protein synthesis	8.51	8.18
YP_007334889.1 Chromosome	<i>rpmE</i>	50S ribosomal protein L31	Protein synthesis	14.18	10.95
YP_007334904.1 Chromosome	<i>rpmJ</i>	50S ribosomal protein L36	Protein synthesis	8.91	6.00
YP_007334990.1 Chromosome	<i>rpsU</i>	30S ribosomal protein S21	Protein synthesis	4.10	4.58
YP_007335204.1 Chromosome	<i>rpmB</i>	50S ribosomal protein L28	Protein synthesis	7.06	6.65
YP_007335344.1 Chromosome	<i>rpsP</i>	30S ribosomal protein S16	Protein synthesis	3.85	3.24
YP_007335345.1 Chromosome	<i>rimM</i>	16S rRNA processing protein RimM	Protein synthesis	2.80	2.91
YP_007335348.1 Chromosome	<i>rplS</i>	50S ribosomal protein L19	Protein synthesis	8.21	8.54
YP_007335513.1 Chromosome	<i>rpmF</i>	50S ribosomal protein L32	Protein synthesis	12.71	10.94
YP_007335588.1 Chromosome	<i>rplU</i>	50S ribosomal protein L21	Protein synthesis	5.66	5.86
YP_007335589.1 Chromosome	<i>rpmA</i>	50S ribosomal protein L27	Protein synthesis	6.07	5.76
YP_007333425.1 Chromosome	<i>fusA</i>	Translation elongation factor G	Protein synthesis	13.04	10.99
YP_007333426.1 Chromosome	<i>tuf</i>	Elongation factor Tu	Protein synthesis	10.93	8.56
YP_007335088.1 Chromosome	<i>infA</i>	Translation initiation factor IF_1	Protein synthesis	7.07	5.62
YP_007333633.1 Chromosome	<i>tsf</i>	Translation elongation factor Ts	Protein synthesis	5.71	5.69
YP_00733479.1 Chromosome	<i>efp</i>	Translation elongation factor P	Protein synthesis	5.51	NDEG
YP_007333111.1 Chromosome	<i>rpoZ</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit omega	Transcription	3.82	3.54
YP_007333420.1 Chromosome	<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit	Transcription	4.88	4.38
YP_007333421.1 Chromosome		DNA-directed RNA polymerase, beta' subunit	Transcription	3.80	3.70
YP_007333452.1 Chromosome	<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit	Transcription	8.56	8.35
YP_007336111.1 pRtrCIAT899b	<i>rpoN</i>	RNA polymerase sigma-54 factor	Transcription	3.95	3.19
YP_007332788.1 Chromosome	<i>atpI2</i>	ATP synthase protein, subunit I	ATP synthesis	3.19	3.68
YP_007332789.1 Chromosome	<i>atpB</i>	ATP synthase F0, A subunit	ATP synthesis	3.06	2.93
YP_007332791.1 Chromosome	<i>atpF</i>	ATP synthase B' chain (Subunit II)	ATP synthesis	4.46	4.08

(Continued)

Table 2. (Continued)

ID / Replicon	Gene name	Function	Biological Role	Fold-change wild-type <sup>a</sup>	Fold-change <i>nodD2</i> mutant <sup>a</sup>
YP_007332792.1 Chromosome	<i>atpF</i>	ATP synthase B chain (Subunit I)	ATP synthesis	3.90	3.40
YP_007335253.1 Chromosome	<i>atpC</i>	ATP synthase F1, epsilon subunit	ATP synthesis	4.31	3.45
YP_007335254.1 Chromosome	<i>atpD</i>	ATP synthase F1, beta subunit	ATP synthesis	3.96	3.37
YP_007335255.1 Chromosome	<i>atpG</i>	ATP synthase F1, gamma subunit	ATP synthesis	3.34	3.38
YP_007335256.1 Chromosome	<i>atpA</i>	ATP synthase F1, alpha subunit	ATP synthesis	3.78	3.51
YP_007335257.1 Chromosome	<i>atpH</i>	ATP synthase F1, delta subunit	ATP synthesis	3.31	4.40
YP_007332861.1 Chromosome	-	Polysaccharide deacetylase	Polysaccharide synthesis	-3.30	-3.01
YP_007333276.1 Chromosome	-	Exopolysaccharide transport	EPS transport	-2.73	-3.64
YP_007335159.1 Chromosome	-	Polysaccharide biosynthesis protein	Polysaccharide synthesis	-4.01	NDEG
YP_007335531.1 Chromosome	<i>ndvA</i>	Cyclic beta-1,2-glucan exporter	Cyclic-glucan transport	4.24	NDEG
YP_007337335.1 pRtrCIAT899c	<i>kpsE</i>	KPS polysaccharide exportation	KPS transport	-10.59	-8.51
YP_007337336.1 pRtrCIAT899c	-	KPS polysaccharide exportation	KPS transport	-13.71	-4.87
YP_007337340.1 pRtrCIAT899c	<i>kpsC</i>	KPS polysaccharide exportation	KPS transport	-6.84	-3.99
YP_007337343.1 pRtrCIAT899c	<i>kpsE</i>	KPS polysaccharide exportation	KPS transport	-7.62	-6.14
YP_007337344.1 pRtrCIAT899c	<i>bexA</i>	ATP-binding protein	Polysaccharide transport	-6.40	-6.38
YP_007337347.1 pRtrCIAT899c	-	Polysaccharide export protein	Polysaccharide transport	-12.45	-6.32
YP_007337762.1 pRtrCIAT899c	<i>exoX</i>	Exopolysaccharide production repressor protein	EPS synthesis repressor	-3.25	-5.08
YP_007337766.1 pRtrCIAT899c	<i>exoZ</i>	Succinoglycan biosynthesis acetyltransferase	EPS synthesis	-2.86	NDEG
YP_007336072.1 pRtrCIAT899b	<i>psiB</i>	Putative polysaccharide inhibition protein	Polysaccharide synthesis repressor	3.05	NDEG
YP_007334642.1 Chromosome	<i>thuA</i>	putative trehalose oxidoreductase	Trehalose catabolism	6.05	5.13
YP_007334643.1 Chromosome	<i>thuB</i>	trehalose utilization protein	Trehalose catabolism	6.53	5.82

<sup>a</sup> Fold induction with respect to CIAT 899 uninduced cultures.

NDEG: non-differentially expressed genes.

Light grey: DEG controlled by NodD2.

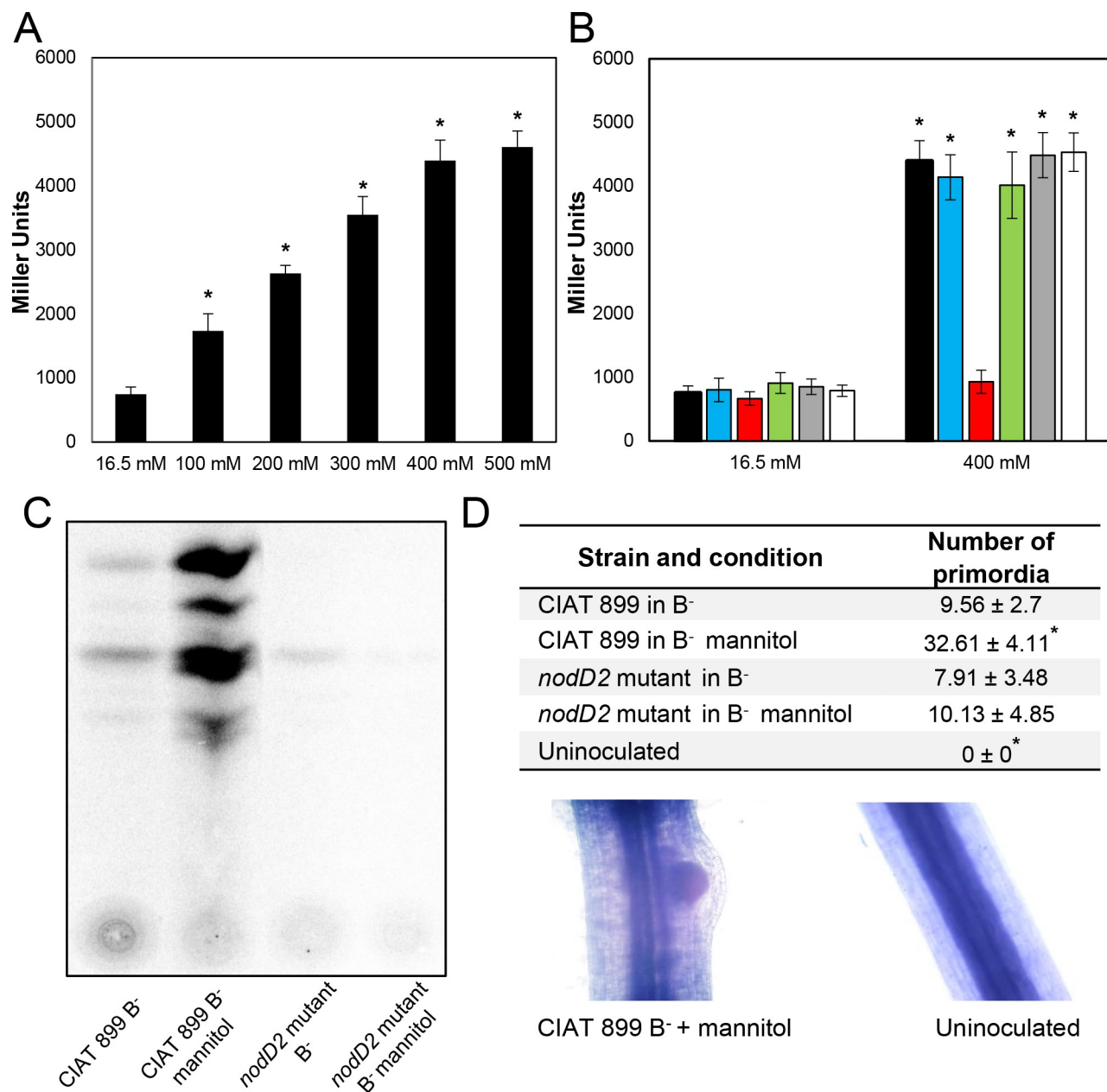
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213298.t002>

presence of 400 mM mannitol (Table 2). However, *thuAB* genes involved in the trehalose catabolism were up-regulated in the presence of mannitol (Table 2). Interestingly, the analysis of DEG indicated that under mannitol conditions, CIAT 899 strongly repressed the *exo* and the *kps* genes involved in the synthesis of exopolysaccharide (EPS) and capsular polysaccharide

(KPS), respectively, but genes involved in the biosynthesis of cyclin glucan (CG) were activated in the presence of mannitol (Table 2). On the other hand, up to 31 genes encoding proteins implied in the production and assembly of the flagellum were strongly down-regulated under mannitol conditions, indicating that this bacterium can reduce motility and chemotaxis when it detects high concentrations of this sugar. Interestingly, some nodulation genes such as *nodA2*, *nodF* and *nodE* (controlled by NB2), *nodA3* and *nodD1* were also up-regulated (ranging from 2.6- to 3.7-fold) in the presence of mannitol, which suggests that this bacterium may be synthesizing NF in the presence of another osmotic-stressing condition different to salt. However, induction levels of these nodulation genes were moderated in comparison with those values previously obtained upon salt induction (from 9.8- to 11.9-fold) [14]. Surprisingly, 19 genes coding for the enzymatic machinery (nitrogenase, ferredoxins and flavoproteins) implied in nitrogen fixation (*nif*, *fix* and *fdx* genes) were also strongly activated when CIAT 899 was grown under mannitol conditions (Fig 2) (Table 2). The up-regulation of this set of genes in the presence of mannitol did not correlate with real N<sub>2</sub> fixation values in acetylene reduction experiments in microaerobiosis, indicating that other signals, molecules or conditions are required to perform this biological process outside of the legume nodule. *A. brasilense* Abv6, the positive control of ARA, was able to fix nitrogen in NFb medium supplemented or not with 400 mM mannitol or ducitol.

### The up-regulation of nodulation genes in the presence of mannitol is controlled by NodD2

Our previous works have demonstrated that CIAT 899 nodulation genes (*nodA1BCSUIJH* [NB1], *nodA2hsnTnodFE* [NB2], and *nodM* [NB3]) are induced in the presence of apigenin and salt (NaCl 300 mM), and the regulation of the expression of these genes is addressed by NodD1 and NodD2, respectively [14,17]. Interestingly, in this RNA-seq study, we observed that among genes involved in nodulation, only those controlled by NB2 were significantly up-regulated in the presence of mannitol (S3 File). In order to elucidate which of the five *nodD* genes present in the CIAT 899 genome is involved in the activation of the *nod* genes in the presence of mannitol, we first performed different  $\beta$ -galactosidase activity assays in YM medium by using a CIAT 899 strain harbouring plasmid pMP240, which harbours the conserved *nodA* promoter of *R. leguminosarum* bv. *viciae* fused to the *lacZ* gene. As expected, the activation level of the *nodA* promoter region at 400 mM of mannitol (condition selected in this study for the RNA-seq) increased almost 6-fold when compared to control conditions (16.5 mM mannitol), supporting data obtained by the RNA-seq assay (Fig 3A). Similar  $\beta$ -galactosidase activity values were reported when inducing with salt [17]. To determine whether one or more of the five CIAT 899 NodD proteins were responsible for the up-regulation of the nodulation genes with mannitol, we performed the same experiments in the five different *nodD* mutant backgrounds, all of them harbouring plasmid pMP240. Results showed that the activation of the nodulation genes in CIAT 899 was mediated by NodD2, since only in the *nodD2* mutant background the *nod* gene induction values in the presence of mannitol remained as in uninduced cultures (Fig 3B). We also performed a global transcriptomic assay in the presence and absence of mannitol in TY medium in the *nodD2* mutant background. RNA-seq data indicated that all the DEG involved in NF synthesis and export previously mentioned were not differentially expressed in this mutant grown with mannitol, supporting previous  $\beta$ -galactosidase activity results (Table 2). Interestingly, some other DEG identified in the wild-type RNA-seq experiments seemed to be directly or indirectly regulated by NodD2, since their expressions were altered in the *nodD2* mutant. Among them, we found some but not all the genes implied in nitrogen fixation, protein folding and synthesis, motility and synthesis of polysaccharides (Table 2).



**Fig 3.** A.  $\beta$ -galactosidase activity of *R. tropici* CIAT 899 carrying plasmid pMP240 under different mannitol concentrations (55–500 mM). B.  $\beta$ -galactosidase activity of *R. tropici* CIAT 899 and its *nodD* mutant derivative strains carrying plasmid pMP240 under 400 mM mannitol. Black, blue, red, green, gray and white bars represent  $\beta$ -galactosidase activity levels of the wild-type, *nodD1* mutant, *nodD2* mutant, *nodD3* mutant, *nodD4* mutant and *nodD5* mutant strains, respectively. Expression data were individually compared with the expression without inducing molecules of the wild-type strain using the Mann-Whitney non-parametrical test. The asterisks (\*) indicate a significant difference at the level  $\alpha = 5\%$ . C. Thin-layer chromatography analysis of Nod factors produced by *R. tropici* CIAT 899 and the *nodD2* mutant grown under control and 400 mM mannitol conditions. D. Biological activity assay of the NF purified from the wild-type and the *nodD2* mutant strain applied to common bean roots. The number of nodule primordia was individually compared to those primordia formed by the wild-type strain using the Mann-Whitney non-parametrical test. The asterisks (\*) indicate a significant difference at the level  $\alpha = 5\%$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213298.g003>

### Nod factors synthesized in the presence of mannitol are biologically active

According to transcriptomic data and  $\beta$ -galactosidase assays, the biosynthesis of NF could be induced by CIAT 899 in response to the osmotic stress generated when this strain grows in the

**Table 3. Structures of Nod Factor synthesized in the presence or absence of 400 mM mannitol by *Rhizobium tropici* CIAT 899 and its *nodD2* mutant derivative.**

NF structure <sup>a</sup>	CIAT 899 <sup>b</sup>	CIAT 899 in B <sup>-</sup> mannitol <sup>b</sup>	<i>nodD2</i> mutant <sup>b</sup>	<i>nodD2</i> mutant in B <sup>-</sup> mannitol <sup>b</sup>
III (C <sub>16:0</sub> )	-	+	-	-
III (C <sub>16:0</sub> , NMe)	-	+	-	-
III (C <sub>18:0</sub> )	-	+	-	-
III (C <sub>18:1</sub> )	-	+	-	-
III (C <sub>18:1</sub> , NMe)	-	+	-	-
III-Hex (C <sub>18:1</sub> )	-	+	-	-
III-Hex (C <sub>18:1</sub> , NMe)	-	+	-	-
IV (C <sub>14:0</sub> )	-	+	-	-
IV (C <sub>14:0</sub> , NMe)	-	+	-	-
IV (C <sub>16:0</sub> )	-	+	-	-
IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)	-	+	-	-
IV (C <sub>16:1</sub> )	-	+	-	-
IV (C <sub>18:0</sub> )	-	+	-	-
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe)	-	+	-	-
IV (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+	+
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	-	+	-	-
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	-	+	-	-
IV (C <sub>20:1</sub> )	-	+	-	-
IV-Hex (C <sub>16:0</sub> , NMe)	-	+	-	-
IV-Hex (C <sub>18:0</sub> )	-	+	-	-
IV-Hex (C <sub>18:0</sub> , NMe)	-	+	-	-
IV-Hex (C <sub>18:1</sub> )	-	+	+	+
V (C <sub>16:0</sub> )	-	+	-	-
V (C <sub>18:1</sub> , NMe) dNac <sup>c</sup>	+	+	-	-
V (C <sub>18:1</sub> , Cb) dNac <sup>c</sup>	-	+	-	-
V (C <sub>18:1</sub> , NMe) dNac <sup>d</sup>	+	+	-	-
V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	-	+	-	-
V (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+	+
V (C <sub>18:0</sub> )	-	+	-	-
V (C <sub>18:0</sub> , S)	-	+	-	-
V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+	+	+
V (C <sub>18:1</sub> , S)	-	+	-	-
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	+	+	-	-
V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	-	+	-	-
V (C <sub>20:1</sub> , NMe)	-	+	-	-
V (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)	-	+	-	-
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>36 (25*)</b>	<b>4</b>	<b>4</b>

**a.** NF structures are represented following the convention in Spaink, 1992 [48] that indicates the number of GlcNAc residues in the backbone (Roman numeral), the length and degree of unsaturation of the fatty acyl chain, and the other substituents, which are listed in the order in which they appear, moving clockwise from the fatty acid. Hex, Hexose; NMe, N-methyl group at glucosamine non-reducing residue; S, sulfate group at reducing glucosamine residue; Cb, carbamoyl group.

**b.** Symbol: + = detected;— = not detected.

**c.** Nod Factor deacetylated at glucosamine residue number 3.

**d.** Nod Factor deacetylated at glucosamine residue number 4.

\* NF also synthesized in the presence of salt [10, 11].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213298.t003>

presence of 400 mM of mannitol. To determine whether these transcriptomic and  $\beta$ -galactosidase experiments correlated with a real NF production, we performed thin layer



chromatography (TLC) in B<sup>-</sup> medium to obtain the NF profiles. Results indicated that the presence of 400 mM mannitol strongly induced NF production in the wild-type strain and, as expected, this overproduction of NF was not detected for the *nodD2* mutant strain (Fig 3C), supporting previous experiments and confirming that the NodD2 protein is directly responsible for the synthesis and export of NF under high mannitol concentration conditions. Besides, to determine the biological activity of these molecules, we analysed the effect of mannitol-induced NF on *P. vulgaris* roots. Interestingly, we observed that even in the case of uninduced CIAT 899 cultures (B<sup>-</sup> medium, 55 mM mannitol), the purified extract slightly induced the formation of primordia as previously observed [17]. However, a significant increase (3-fold) in the number of primordia was observed when NF purified from the wild-type strain grown in B<sup>-</sup> medium with 400 mM of mannitol were added (Fig 3D). In the case of the biological activity of NF obtained from the *nodD2* mutant, the number of induced primordia was similar to those obtained by CIAT 899 in control conditions, indicating that the NF induced by mannitol are biologically active. Lastly, the NF produced by the wild-type and the *nodD2* mutant strain in B<sup>-</sup> medium supplemented or not up to 400 mM mannitol were identified by UHPLC-MS/MS (Table 3). As expected, 36 different NF were found in supernatants of CIAT 899 cultures supplemented up to mannitol 400 mM, 25 of them were also produced in the presence of salt [10,11]. Only 6 and 4 nodulation factors were found in the wild-type cultures under control conditions or in both conditions in the *nodD2* mutant strain, respectively, confirming that synthesis and export of these symbiotic molecules is controlled by NodD2. Basal production of NF in *R. tropici* CIAT 899 has been previously reported [10,11], and could be responsible for the formation of nodule primordia even in the absence of inducing molecules [17] (Fig 3D).

### ***nod* gene expression and Nod factor production are also enhanced in the presence of a non-metabolizable sugar**

In order to unequivocally assert that the osmotic stress caused by high mannitol concentration is responsible for the synthesis and export of Nod factors in *R. tropici* CIAT 899, we wondered whether this biological process is also launched in the presence of a non-metabolizable sugar. For this purpose, by using the API 50CH system, it was determined that CIAT 899 is unable to use and grow using sugars as unique carbon source, such as dulcitol, amygdaline, xylitol, arabinol, inuline or raffinose. For further experiments we selected dulcitol as non-metabolizable sugar, since this molecule is an isomeric form of mannitol, being both polyol sugars that have the same molecular weight (182.172 g/l) and empirical formula of C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>. As expected, in the presence of increasing amounts of dulcitol, *nod* gene expression was enhanced, reaching at 383.5 mM dulcitol (+ mannitol 16.5 mM) similar values of β-galactosidase activity than those obtained with 400 mM mannitol (Figure A in S7 File). As expected, the CIAT 899 NF profile in the presence of dulcitol was similar to that obtained with 400 mM mannitol (Figure B in S7 File). Finally, both findings correlate with the synthesis and export of 35 different nodulation factors when CIAT 899 cultures were induced with dulcitol (Figure C in S7 File). Interestingly, most of these molecules were also identified upon induction with mannitol (29 out of 35), suggesting that both processes are carried out in a similar way. In conclusion, these results indicate that *R. tropici* CIAT 899 produces Nod factors in response to a non-ionic osmotic stress independently of the catabolism of the metabolite.

## **Discussion**

The osmolarity of the environment is one of the physical parameters that determines the capacity of organisms to proliferate in different habitats [38]. Our RNA-seq analysis revealed



different genomic traits related to osmotic-stress tolerance in *R. tropici* CIAT 899 (Figs 1 and 2). Similar patterns of transcriptomic responses have been previously described for other bacteria in response to different abiotic-stresses. Common DEG encode proteins involved in the correct folding of proteins, chemotaxis, accumulation of organic osmolytes like glycerol, production of cyclic  $\beta$ -(1, 2)-glucans, transcription and translation or in the generation of energy (S2 File) [14,39–43].

*R. tropici* CIAT 899 harbours in its genome the genes necessary for the biosynthesis of trehalose, which could be used as a compatible solute in hyperosmotic conditions. However, transcriptomic data indicated that the *otsA* and *otsB* genes, involved in the biosynthesis of trehalose, are not differentially expressed when CIAT 899 was grown in the presence of mannitol. Fernández-Aunión et al., 2010 [44] have verified that although trehalose accumulation in CIAT899 is osmoregulated, the internal concentration of this osmolyte is not enough to explain high saline stress tolerance in *R. tropici* CIAT 899. The authors suggest that CIAT 899 should be accumulating other molecules such as cyclic  $\beta$ -1, 2 glucans in response to osmotic stress. In fact, the *ndvA* gene, which codes for the protein responsible for the synthesis and export of cyclic  $\beta$ -1, 2-glucans was up-regulated (Table 2). Moreover, the *thuAB* genes, involved in trehalose catabolism, were up-regulated in the presence of mannitol (Table 2).

To sum up, CIAT 899 does not accumulate trehalose in response to osmotic stress conditions but, instead, it degrades this carbohydrate. This fact could be explained because this osmolyte tends to accumulate during symbiosis, but it is toxic to plants [45]. To solve this problem, the bacterium would produce trehalose-degrading enzymes, but in turn, it would accumulate glycerol and cyclic glucans as compatible osmolytes in response to higher mannitol concentrations.

One of the biggest achievements in this study relies on the finding of the capacity of CIAT 899 to induce not only the expression of nodulation genes but also nitrogen fixation-associated genes under mannitol stressing conditions (Table 2). Besides, in contrast to previous transcriptomic reports with CIAT 899 grown in the presence of flavonoids or salt [14], not all the nodulation operons were up-regulated with mannitol (only the *nodA2nodEF* operon, the *nodA3* gene and the *nodD1* gene) (S3 File). However, these transcriptomic changes are enough to cause an increase in the production of biologically active NF under mannitol conditions (Fig 3, Table 3). Interestingly, the synthesis and export of these symbiotic molecules was also enhanced when this bacterium was grown with other non-metabolizable sugar (dulcitol), indicating that Nod factor production is specifically triggered by non-ionic osmotic stress, independently of the use of the metabolite that causes the stress (S7 File). On the other hand, in the same manner as with saline stress [17], the mannitol-mediated NF production and export is controlled directly by the NodD2 protein (Fig 3, Tables 2 and 3, S3 File). Besides, NodD2 is not only controlling the expression of nodulation genes but also the expression of other genes involved in protein folding and synthesis, motility, synthesis of polysaccharides and nitrogen fixation (Table 3, S3 File).

It has been well described that high concentrations of organic acids are secreted by plants to the rhizosphere. In these conditions, CIAT 899 could be synthesising NF. In fact, RNA-seq assays from *R. leguminosarum* biovar *viciae* present in pea, alfalfa and sugar cane rhizospheres showed that genes coding for proteins related to sugar transport and catabolism are highly activated, including the same genes associated to mannitol catabolism (*mtlD* and *mtlE*) [46] also induced in the present study. Our hypothesis is that *R. tropici* CIAT 899 induces NF production in the presence of high concentrations of osmolytes to ensure the symbiotic interaction with legumes even in the absence of inducing flavonoids. This could be a strategy to overcome osmotic-stressing conditions. Interestingly, a recent study showed that in the symbiotic interaction between *Mesorhizobium loti* R7A and *Lotus japonicus*, NodD1 is activated

during progression through the infection thread and this activation is required for a proficient symbiotic infection [4]. Thus, the mannitol-related induction of the nodulation genes in CIAT 899 (*nodF*, *nodE*, *nodA2*, *nodA3* and *nodD1*) could be indicating also that this activation may be taking place also during the development of the infection thread or even within the nodule, where high concentrations of osmolytes are expected. In this manner, the production of these symbiotic molecules in *R. tropici* CIAT 899 under high osmotic concentration could be occurring to support since the beginning to the end the symbiotic process. In these symbiotic environments, the activation of other genes important for late stages of the symbiotic process, such as some *fix*, *nif* or *fdx* genes, which encode proteins components of the nitrogenase machinery, could be explained (Table 2). Interestingly, the gene coding for the sigma factor 54 (YP\_007336111.1), which has been widely described as responsible for *nif* and *fix* genes activation in microaerobiosis in several rhizobial strains within the nodule [47], showed a significant activation under mannitol conditions (Table 2). Thus, the activation of the whole nitrogen-fixing cluster under mannitol conditions could be a reflect of the transcriptomic changes that CIAT 899 endures in the legume nodule. Thereby, in the same manner as in the case of the NF synthesis and export, CIAT 899 could be ensuring nitrogen fixation inside the nodule not only by means of microaerobic conditions but also under high concentrations of osmolites present within the nodule. Nevertheless, further works are necessary to elucidate the full correlation between osmotic-stress and rhizobia-legume symbiosis.

## Supporting information

### **S1 File. General features of the total sequenced and mapped reads.**

(DOCX)

### **S2 File. Whole genome differential expression in *R. tropici* CIAT 899 cultures supplemented with 400 mM mannitol.** Fold-change values are obtained in comparison with the cultures of the same strain without mannitol.

(XLSX)

### **S3 File. Whole genome differential expression in the *nodD2* mutant cultures supplemented with 400 mM mannitol.** Fold-change values are obtained in comparison with the cultures of the same strain without mannitol.

(XLSX)

### **S4 File. Genes and primer sequences for qRT-PCR assays.** Correlation degrees between RNA-Seq and qRT-PCR experiments. qRT-PCR and RNA-Seq fold-change values of 10 selected genes were represented in a graph to obtain the correlation degrees.

(XLSX)

### **S5 File. Growth-rate curve of *R. tropici* CIAT 899 in TY medium at increasing concentrations of mannitol (55–1000 mM).**

(TIF)

### **S6 File. Representation of the distribution of the genes of *R. tropici* CIAT 899 in its chromosome and different plasmids.** In addition, the transcriptome results and distribution in the chromosome and plasmid of the wild-type strain under 400 mM mannitol are represented. DEG: Differentially expressed genes.

(TIF)

### **S7 File. A. $\beta$ -galactosidase activity of *R. tropici* CIAT 899 carrying plasmid pMP240 grown with 16.5 mM mannitol and induced with different dulcitol concentrations (0–483.5 mM).**

Expression data were individually compared with the expression without inducing molecules of the wild-type strain using the Mann-Whitney non-parametrical test. The asterisks (\*) indicate a significant difference at the level  $\alpha = 5\%$ . **B.** Thin-layer chromatography analysis of Nod factors produced by *R. tropici* CIAT 899 grown under control and 383.5 mM dulcitol conditions (both containing 16.5 mM mannitol). **C.** Structures of Nod Factor synthesized in the presence or absence of 345 mM dulcitol (supplemented with 55 mM mannitol) by *Rhizobium tropici* CIAT 899. NF structures are represented following the convention in Spaink, 1992 [48] that indicates the number of GlcNAc residues in the backbone (Roman numeral), the length and degree of unsaturation of the fatty acyl chain, and the other substituents, which are listed in the order in which they appear, moving clockwise from the fatty acid. Hex, Hexose; NMe, N-methyl group at glucosamine non-reducing residue; S, sulfate group at reducing glucosamine residue; Cb, carbamoyl group. \*NF also synthesized in the presence of mannitol. (TIF)

## Acknowledgments

This work was funded with project AGL2016-77163-R from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). Mr. Del Cerro is recipient of an FPU fellowship (FPU14/00160) of the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). We would like to thank the Servicio de Espectrometría de Masas, Servicio de Resonancia Magnética Nuclear and Servicio de Biología of the Centro de Investigación Tecnología e Innovación (CITIUS) of the University of Seville for technical support.

## Author Contributions

**Funding acquisition:** Antonio Gil-Serrano, Francisco Javier Ollero.

**Investigation:** Pablo del Cerro, Manuel Megías, Francisco Javier López-Baena, Antonio Gil-Serrano, Francisco Pérez-Montaño, Francisco Javier Ollero.

**Methodology:** Manuel Megías.

**Project administration:** Antonio Gil-Serrano, Francisco Javier Ollero.

**Resources:** Francisco Javier Ollero.

**Supervision:** Francisco Javier López-Baena, Francisco Pérez-Montaño, Francisco Javier Ollero.

**Writing – original draft:** Francisco Pérez-Montaño, Francisco Javier Ollero.

**Writing – review & editing:** Manuel Megías, Francisco Javier López-Baena, Francisco Pérez-Montaño, Francisco Javier Ollero.

## References

1. Zipfel C, Oldroyd GE. Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature*. 2017; 543: 328–336. <https://doi.org/10.1038/nature22009> PMID: 28300100
2. Dénarié J, Debellé F, Promé JC. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem*. 1996; 65: 503–535. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002443> PMID: 8811188
3. Yeh KC, Peck MC, Long SR. Luteolin and GroESL modulate in vitro activity of NodD. *J Bacteriol*. 2002; 184: 525–530. <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.525-530.2002> PMID: 11751831
4. Kelly S, Sullivan JT, Kawaharada Y, Radutoiu S, Ronson CW, Stougaard J. Regulation of Nod factor biosynthesis by alternative NodD proteins at distinct stages of symbiosis provides additional

- compatibility scrutiny. *Environ Microbiol.* 2018; 20: 97–110. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14006> PMID: 29194913
5. Morón B, Soria-Díaz ME, Ault J, Verroios G, Noreen S, Rodríguez-Navarro DN, et al. Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. *Chem Biol.* 2005; 12: 1029–1040. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.06.014> PMID: 16183027
6. Estévez J, Soria-Díaz ME, De Córdoba FF, Morón B, Manyani H, Gil A, et al. Different and new Nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899 following Na<sup>+</sup> stress. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 293: 220–231. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01540.x> PMID: 19260963
7. Guasch-Vidal B, Estévez J, Dardanelli MS, Soria-Díaz ME, de Córdoba FF, Balog CIA, et al. High NaCl concentrations induce the *nod* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899 in the absence of flavonoid inducers. *Molecular Plant-Microbe Interact.* 2013; 26: 4451–460.
8. Ormeño-Orrillo E, Menna P, Almeida LGP, Ollero FJ, Nicolás MF, Rodrigues EP, et al. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics.* 2012; 13: 735. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-735> PMID: 23270491
9. Poupot R, Martínez-Romero E, Promé JC. Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or non-sulfated chitopentasaccharides containing an *N*-methyl-*N*-acylglucosaminyl terminus. *Biochem.* 1993; 32: 10430–10435.
10. del Cerro P, Rolla-Santos AA, Gomes DF, Marks BB, Pérez-Montaño F, Rodríguez-Carvajal MÁ, et al. Regulatory *nodD1* and *nodD2* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 and their roles in the early stages of molecular signaling and host-legume nodulation. *BMC Genomics.* 2015; 16: 251. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1458-8> PMID: 25880529
11. del Cerro P, Rolla-Santos AA, Gomes DF, Marks BB, Espuny MR, Rodríguez-Carvajal MÁ, et al. Opening the “black box” of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899. *BMC Genomics.* 2015; 16: 864. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2033-z> PMID: 26502986
12. Zahran HH. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe condition sand in an arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999; 63: 968–989. PMID: 10585971
13. Nogales J, Campos R, BenAbdelkhalek H, Olivares J, Lluch C, Sanjuan J. *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2002; 15: 225–232. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.3.225> PMID: 11952125
14. Pérez-Montaño F, del Cerro P, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Cubo MT, Hungria M, et al. RNA-seq analysis of the *Rhizobium tropici* CIAT 899 transcriptome shows similarities in the activation patterns of symbiotic genes in the presence of apigenin and salt. *BMC Genomics.* 2016; 17: 198. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2543-3> PMID: 26951045
15. Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J Syst Bacteriol.* 1991; 41: 417–426. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-417> PMID: 1715738
16. Hungria M, Andrade DS, Chueirea LMO, Probanza A, Gutiérrez-Mañero FJ, Megías M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol Biochem.* 2000; 21: 1515–1528.
17. del Cerro P, Pérez-Montaño F, Gil-Serrano A, López-Baena FJ, Megías M, Hungria M, et al. The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. *Sci Rep.* 2017; 7: 46712. <https://doi.org/10.1038/srep46712> PMID: 28488698
18. Beringer JE. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol.* 1974; 84: 188–198. <https://doi.org/10.1099/00221287-84-1-188> PMID: 4612098
19. Spaink HP, Aarts A, Stacey G, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ, Kennedy EP. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using thin-layer chromatography. *Mol Plant Microbe Interact.* 1992; 5: 72–80. PMID: 1600238
20. Vincent JM. The modified Fåhræus slide technique. In: A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford UK. 1970. pp. 144–145.
21. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. USA. 1989.
22. Lamrabet Y, Bellogín RA, Cubo T, Espuny MR, Gil-Serrano A, Krishnan HB, et al. Mutation in GDP fucose synthesis genes of *Sinorhizobium fredii* alters Nod factors and significantly decreases competitiveness to nodulate soybeans. *Mol Plant Microbe Interact.* 1999; 12: 207–217. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.3.207> PMID: 10065558

23. de Maagd RA, Wijffelman CA, Pees E, Lugtenberg BJJ. Detection and subcellular localization of two Sym plasmid-dependent proteins of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. J Bacteriol. 1988; 170: 4424–4427. PMID: [3410833](#)
24. Langmead B, Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods. 2012; 9: 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923> PMID: [22388286](#)
25. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. Bioinformatics. 2009; 25: 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352> PMID: [19505943](#)
26. Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. Bioinformatics. 2011; 27: 2987–2993. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr509> PMID: [21903627](#)
27. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics. 2014; 31:166–169.
28. Love MI, Huber W and Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 2014; 15: 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8> PMID: [25516281](#)
29. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J Royal Statistic Soc. 1995; 57: 289–300.
30. Baldani VL, Döbereiner J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. Soil Biol Biochem. 1980; 12: 433–439.
31. Buendía-Clavería AM, Ruiz-Sainz JE, Cubo-Sánchez T, Pérez-Silva J. Studies of symbiotic plasmids in *Rhizobium trifolii* and fast-growing bacteria that nodulate soybeans. J Appl Bacteriol. 1986; 61: 1–9.
32. Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasiliense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. Plant Soil. 2010; 331: 413–425.
33. Zaat SA, Wijffelman CA, Spaink HP, van Brussel AA, Okker RJ, Lugtenberg BJ. Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI by plant flavanones and flavones. J Bacteriol. 1987; 169: 198–204. PMID: [3539915](#)
34. Miller JH. Experiment in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, NY USA. 1972.
35. del Cerro P, Rolla-Santos AA, Valderrama-Fernández R, Gil-Serrano A, Bellogín RA, Gomes DF, et al. NrcR, a new transcriptional regulator of *Rhizobium tropici* CIAT 899 involved in the legume root-nodule symbiosis. PLoS One. 2016; 11: e0154029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154029> PMID: [27096734](#)
36. López-Lara IM, van Der Drift KM, van Brussel AA, Haverkamp J, Lugtenberg BJ, Thomas-Oates JE, et al. Induction of nodule primordia on Phaseolus and Acacia by lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from broad-host-range Rhizobium strain GRH2. Plant mol. biol. 1995; 29(3): 465–477. PMID: [8534846](#)
37. Truchet G, Camut S, de Billy F, Odorico R, Vasse J. The *Rhizobium*-legume symbiosis. Two methods to discriminate between nodules and other root derived structures. Protoplasma. 1989; 149: 82–89.
38. Csonka LN. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiol Rev. 1989; 53: 121–147. PMID: [2651863](#)
39. Breedveld MW, Zevenhuizen LP, Zehnder AJ. Osmotically-regulated trehalose accumulation and cyclic  $\beta$ -(1, 2)-glucan excretion by *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA-1. Arch Microbiol. 1991; 156: 501–506.
40. Burg MB, Ferraris JD. Intracellular organic osmolytes: function and regulation. J Biol Chem. 2008; 283: 7309–7313. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700042200> PMID: [18256030](#)
41. Alexandre A, Oliveira S. Most heat-tolerant rhizobia show high induction of major chaperone genes upon stress. FEMS Microbiol Ecol. 2010; 75: 28–36. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00993.x> PMID: [21073488](#)
42. Picard F, Loubière P, Girbal L, Coccagn-Bousquet M. The significance of translation regulation in the stress response. BMC Genomics. 2013; 14: 588. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-588> PMID: [23985063](#)
43. Alexandre A, Laranjo M, Oliveira S. Global transcriptional response to heat shock of the legume symbiont *Mesorhizobium loti* MAFF303099 comprises extensive gene downregulation. DNA Res. 2013; 21: 195–206. <https://doi.org/10.1093/dnares/dst050> PMID: [24277738](#)
44. Fernández-Aunión C, Ben Hamouda T, Iglesias-Guerra F, Argandoña M, Reina-Bueno M, Nieto JJ, et al. Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. BMC Microbiol. 2010; 10: 192. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-192> PMID: [20633304](#)

45. Boboye B. Degradation of trehalose by rhizobia and characteristics of a trehalose-degrading enzyme isolated from *Rhizobium* species NGR234. J Appl Microbiol. 2004; 97: 256–261. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02194.x> PMID: [15239691](#)
46. Ramachandran VK, East AK, Karunakaran R, Downie JA, Poole PS. Adaptation of *Rhizobium leguminosarum* to pea, alfalfa and sugar beet rhizospheres investigated by comparative transcriptomics. Genome Biology. 2011; 12: R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-10-r106> PMID: [22018401](#)
47. Jiménez-Guerrero I, Acosta-Jurado S, del Cerro P, Navarro-Gómez P, López-Baena FJ, Ollero FJ, et al. Transcriptomic studies of the effect of nod gene-inducing molecules in rhizobia: different weapons, one purpose. Genes. 2017; 9: 1.
48. Spaink HP. Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and questions. Plant Molecular Biology. 1992; 20: 977–986. PMID: [1463833](#)